

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Determinación del tiempo máximo para recuperar y
criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del
epidídimo de caninos post orquiectomía**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Sandra Mariel Armas Reynoso

Lima-Perú

2009

*Dedicado a la más increíble persona que ha podido existir
y de quien herede esta espectacular vocación...*

"El amor hacia los animales"

"¡Gracias Abue!"

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alexei Santiani, director de esta tesis.

Mi más sincera gratitud por confiar en mí para la realización de este estudio.

¡Gracias por su apoyo, por sus enseñanzas y por su paciencia!

A mis padres Jorge y América.

Gracias por el cariño y confianza que me brindan en todo momento;

pero sobre todo gracias por estar, cada uno a su manera,

respaldándome día a día para alcanzar mis objetivos.

A Daniel.

Gracias por ese inmenso amor y apoyo que siempre me brindas.

¡Te amo!

A Gino Carlotto.

Gracias por tu inigualable disponibilidad para enseñarme, con toda la paciencia del mundo, las labores que se realizan en el Laboratorio de Reproducción Animal.

Y gracias por colaborar incondicionalmente en este estudio.

A Yesenia y Jaime, amigos Médicos Veterinarios de la Municipalidad de La Molina.

Gracias por su importante cooperación para conmigo.

A Gina Castro, bachiller adscrita 2008 del curso de Cirugía Veterinaria.

Gracias por tu ayuda en la obtención de muestras.

A Diana y Perseo.

Nunca olvidaré su valiosa compañía... ¡Gracias!

A Jennifer y Randolph.

Mil Gracias por todo ese gran apoyo que me brindaron

en esos difíciles momentos que pase... Gracias!

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
2.1. Anatomía y fisiología reproductiva del canino macho	3
2.2. Características del semen canino	6
2.3. Características del espermatozoide canino	7
2.4. Métodos de evaluación del semen canino	10
2.4.1. Evaluación macroscópica del semen	10
2.4.2. Evaluación microscópica del semen	11
2.5. Criopreservación del semen canino	14
2.5.1. Dilutores del semen canino	14
2.5.2. Procesamiento del semen canino	18
2.5.3. Efecto de la criopreservación sobre la función espermática del semen canino	21
2.6. Recuperación y criopreservación de espermatozoides epididimarios caninos	23
2.6.1. El epidídimo: Estructura y función	23
2.6.2. Métodos de recuperación de espermatozoides epididimarios caninos	26
2.6.3. Medios utilizados para la recuperación de espermatozoides epididimarios caninos	27

2.6.4.	Espermatozoides epididimarios caninos	27
2.6.5.	Congelamiento de espermatozoides epididimarios	28
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1.	Lugar de estudio y Animales	31
3.2.	Recolección de muestras	31
3.3.	Metodología	31
3.3.1.	Recuperación de espermatozoides epididimarios	32
3.3.2.	Evaluación de espermatozoides epididimarios antes del proceso de criopreservación	33
3.3.3.	Criopreservación de espermatozoides epididimarios	35
3.3.4.	Evaluación de espermatozoides epididimarios después del proceso de criopreservación	35
3.4.	Análisis estadístico	36
IV.	RESULTADOS	37
V.	DISCUSIÓN	42
VI.	CONCLUSIONES	49
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
VIII.	APÉNDICE	68

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
dl	decilitro
DMSO	Dimetilsulfóxido
FSH	Hormona folículo estimulante
GTP	Guanosin trifosfato
HOST	Test hiposmótico
IFM	Integridad funcional de membrana
kDa	kilodalton
Kg	Kilogramo
MF	Morfología
mg	miligramo
ml	mililitro
mOsm	miliosmol
MP	Motilidad progresiva
MT	Motilidad total
μl	microlitro
μm	micra, micrómetro

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar el tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo de caninos post orquiectomía. Los testículos/epidídimos fueron obtenidos después de la orquiectomía de 20 caninos adultos aparentemente saludables con edades entre 1 y 8 años. Los testículos/epidídimos fueron colocados en cloruro de sodio al 0.9% y almacenados a 5°C durante 0, 24, 48 y 72 horas. Los espermatozoides fueron recuperados al cortar la cola del epidídimo suspendido en dilutor Tris-citrato-fructosa. Para el proceso de criopreservación, a la muestra diluida (espermatozoides + dilutor) se le añadió yema de huevo (20%) y glicerol (5%). La nueva dilución fue envasada en pajillas de 0.5ml, las cuales fueron sometidas a una curva de enfriamiento para luego ser colocadas en nitrógeno líquido. Los parámetros evaluados fueron: Motilidad total, motilidad progresiva e integridad funcional de membrana; parámetros que fueron analizados antes y después de la criopreservación. Adicionalmente se obtuvieron datos sobre morfología y concentración, evaluadas sólo antes de la criopreservación. Todos los parámetros evaluados disminuyeron gradualmente a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento, los cuales al ser evaluados a las 48 horas de almacenamiento, antes y después del proceso de criopreservación, no variaron significativamente con respecto a los evaluados a las 0 horas. Sin embargo, cabe resaltar que todos los valores obtenidos después del proceso de criopreservación fueron marcadamente inferiores a los obtenidos antes del proceso.

Palabras clave: espermatozoide, epidídimo, canino, criopreservación de semen

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the maximum time to recover and cryopreserve sperm from the tail of the epididymis of canine post-orchietomy. The testes/epididymides were obtained by orchietomy of 20 apparently healthy adult dogs between 1 to 8 years old. The testes/epididymides were placed in sodium chloride 0.9% and stored at 5 ° C for 0, 24, 48 and 72 hours. Sperm were recovered by cutting the tail of the epididymis dilutor suspended in Tris-citrate-fructose. For the cryopreservation process, the diluted sample (sperm + dilutor) was added egg yolk (20%) and glycerol (5%). The new dilution was packaged in 0.5ml straws, which were subjected to a cooling curve to be later placed in liquid nitrogen. The parameters evaluated were: Total motility, progressive motility and membrane functional integrity; parameters were analyzed before and after cryopreservation. Additionally, data were obtained on morphology and concentration, evaluated just before the cryopreservation. All evaluated parameters decreased gradually when the storage time increased. Such parameters to be evaluated at 48 hours of storage, before and after the cryopreservation process, did not differ significantly from those evaluated at 0 hours. However, it is noted that all values obtained after the cryopreservation process were markedly lower than those obtained before process.

Keywords: sperm, epididymis, canine, semen cryopreservation

LISTA DE CUADROS

Nº	TÍTULO	PÁGINA
Cuadro 1.	Modelo de distribución de muestras obtenidas para el estudio	32
Cuadro 2.	Efecto del tiempo (0, 24, 48 y 72 horas) entre la muerte u orquiectomía de caninos hasta la recuperación de espermatozoides del epidídimo en caninos sobre la calidad espermática antes del proceso de criopreservación	37
Cuadro 3.	Efecto del tiempo (0, 24, 48 y 72 horas) entre la muerte u orquiectomía de caninos hasta la recuperación de espermatozoides del epidídimo sobre la calidad espermática después del proceso de criopreservación	38
Cuadro 4.	Efecto del tiempo (0, 24, 48 y 72 horas) entre la muerte u orquiectomía de caninos hasta la recuperación de espermatozoides del epidídimo sobre la morfología y concentración espermática antes del proceso de criopreservación	41

LISTA DE FIGURAS

Nº	TÍTULO	PÁGINA
Figura 1.	Representación esquemática de la espermatogénesis en caninos	5
Figura 2.	Características del espermatozoide canino	8
Figura 3.	Dibujo esquemático del sistema tubular del epidídimo y testículo del canino	24
Figura 4.	Representación esquemática de la apariencia morfológica de un espermatozoide no reaccionante y reaccionante al Test hiposmótico	33
Figura 5.	Frecuentes anomalías morfológicas en espermatozoides caninos	34
Figura 6.	Curva de tendencia en el tiempo para el parámetro de motilidad total evaluado antes y después de la criopreservación de espermatozoides epididimarios caninos	39
Figura 7.	Curva de tendencia en el tiempo para el parámetro de motilidad progresiva evaluado antes y después de la criopreservación de espermatozoides epididimarios caninos	39
Figura 8.	Curva de tendencia en el tiempo para el parámetro de integridad funcional de membrana evaluado antes y después de la criopreservación de espermatozoides epididimarios caninos	40

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la criopreservación de semen canino es una herramienta importante para preservar espermatozoides de reproductores valiosos. Para su desarrollo, se utilizan muestras de semen colectadas por distintos métodos, sin embargo, existen eventos no predecibles como accidentes, intoxicaciones o enfermedades que súbitamente pueden desencadenar en la orquiectomía, la muerte o eutanasia de perros de valor genético ó sentimental. En estos casos, los propietarios no sólo deben afrontar la pérdida del animal, sino también la pérdida del material genético deseable. En ese sentido, es posible obtener espermatozoides hasta cierto tiempo después de la muerte del animal, los cuales son recuperados de la cola del epidídimo con motilidad y capacidad fecundante (Yu *et al.*, 2002); esto se debe, principalmente, a que en el epidídimo se realizan dos eventos importantes: la maduración y el almacenamiento espermático. La maduración o desarrollo progresivo de la capacidad fecundante de los espermatozoides ocurre en la cabeza y el cuerpo del epidídimo y el almacenamiento ocurre en la cola del epidídimo (Hafez, 2002). Es así, que la obtención de espermatozoides epididimarios, potencialmente fecundantes que se encuentran almacenados en la cola del epidídimo puede ser la única opción para preservar el material genético de un macho de alto valor genético luego de su muerte u orquiectomía por motivos médicos (Tittarelli *et al.*, 2007).

Se han realizado estudios sobre recuperación y criopreservación espermática epididimal en bovinos (Amann y Griel, 1976), equinos (Bruemmer *et al.*, 2002), ovinos (Kaabi *et al.*, 2003), caprinos (Blash *et al.*, 2000), porcinos (Ikeda *et al.*, 2002). En caninos, existen estudios sobre recuperación, refrigeración y/o criopreservación de espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo. Hewitt *et al.* (2001) estudiaron el efecto de la criopreservación de espermatozoides recuperados de la cola del

epidídimo inmediatamente después de la orquitectomía sobre diferentes variables espermáticas. Asimismo, Yu *et al.* (2002) estudiaron el efecto sobre la motilidad, integridad de membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides epididimarios refrigerados a 4°C, mientras que Tittarelli *et al.* (2006) evaluaron la capacidad de supervivencia de los espermatozoides caninos mantenidos dentro de epidídimos almacenados a 4°C por 24, 48 o 72 horas en solución salina isotónica estéril y Tris-yema de huevo. Sin embargo, el hecho de recuperar espermatozoides de un macho recientemente muerto o sacrificado, implica que existe interés en utilizar sus gametos con fines de conseguir crías en algún momento. Como estos eventos pueden ocurrir súbitamente, es poco probable que en ese momento existan hembras en celo listas para ser inseminadas; por lo tanto, los espermatozoides recuperados de un macho deberán ser criopreservados para poder mantenerlos por un período indefinido de tiempo hasta su utilización. En ese sentido, existe escasa información de si espermatozoides que son recuperados luego de varias horas o días de los epidídimos mantenidos a 5°C pueden ser congelados manteniendo su capacidad fecundante.

Es por lo anteriormente mencionado, que el presente trabajo tiene por objetivo evaluar el efecto del tiempo transcurrido desde la muerte u orquitectomía de un perro hasta la recuperación de los espermatozoides del epidídimo sobre la calidad espermática antes y después del proceso de criopreservación, y así, determinar el tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides del epidídimo, sin alteración de su funcionalidad.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. Anatomía y fisiología reproductiva del canino macho

El aparato reproductor del macho está compuesto por un número de órganos que actúan de manera conjunta para producir espermatozoides y depositarlos en el tracto genital de la hembra. Este esfuerzo conjunto implica tanto al sistema neuroendocrino (hipotálamo y adenohipófisis) así como al genital (Cunningham, 2003) que está conformado por los testículos, epidídimos, conductos deferentes, glándulas accesorias y el pene (Feldman y Nelson, 2000). Los testículos, son los órganos centrales del aparato reproductor del macho, se encuentran suspendidos dentro del escroto por el cordón espermático y el músculo cremáster externo, son los responsables de la esteroidogénesis, principalmente de la producción de andrógenos, así como de la generación de células germinales haploides mediante la espermatogénesis. Estas dos funciones ocurren en las células de Leydig y en los túbulos seminíferos, respectivamente (Cunningham, 2003). El epidídimo es el que proporciona el ambiente necesario para llevarse acabo la maduración final de los espermatozoides y sirve como órgano de almacenamiento para estas células (Getty, 1981; Johnston *et al.*, 2001). El conducto deferente es un tubo muscular liso que, en el momento de la eyaculación, impulsa los espermatozoides desde el epidídimo hacia el conducto eyaculador de la uretra prostática (Frandsen y Spurgeon, 1995). La próstata, es la única glándula accesoria presente en el perro, produce el plasma seminal, la cual tiene la función de proteger y nutrir a los espermatozoides (Getty, 1981; Johnston *et al.*, 2001). El pene se encuentra protegido por el prepucio y es el órgano copulador del macho (Cunningham, 2003). En los perros, el pene posee algunas características peculiares como la presencia del hueso peniano en su interior y de un bulbo de tejido

esponjoso eréctil, que proporciona el “enganche” con la hembra durante la cópula (Getty, 1981; Johnston *et al.*, 2001).

El desarrollo de las gónadas y de la espermatogénesis en los caninos es similar a lo que ocurre en otros mamíferos (Johnston *et al.*, 2001). Durante el desarrollo embrionario las células germinales primordiales pasan por diversas fases de multiplicación y se diferencian en espermatogonias; bloqueándose su desarrollo hasta que el animal alcance la madurez sexual (Engelhardt y Breves, 2005).

El descenso de los testículos ocurre entre las dos y ocho semanas de edad (Kawakami *et al.*, 1991). La pubertad en el canino ocurre entre los nueve y doce meses de edad, siendo marcada por el apareamiento de los primeros espermatozoides en el eyaculado. Sin embargo, algunos caninos pueden ser fértiles a los 6 meses de edad (Christiansen, 1988). Con el inicio de la pubertad se activa el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y se induce la espermatogénesis por efecto de la FSH y la testosterona (Engelhardt y Breves, 2005).

La espermatogénesis (Fig. 1), desencadenado en los túbulos seminíferos (Foote *et al.*, 1972), se divide en tres procesos principales: a) *Espermatocitogénesis*, en la cual las espermatogonias experimentan una división mitótica, una parte de estas espermatogonias se conserva como población celular germinal, mientras que otra parte se siguen diferenciando en espermatoцитos primarios hasta iniciar una meiosis. Los espermatoцитos primarios son las células germinales mayores del epitelio germinal, sin embargo todavía son diploides es decir, en total poseen cuatro juegos de ADN (ADN 4n), durante la primera división meiótica se forman espermatoцитos secundarios haploides (ADN 2n), estos entran inmediatamente en la segunda división meiótica en la que cada una de las espermatidas obtenidas solamente contiene una copia de todo el juego cromosómico (ADN 1n), por lo tanto, en la meiosis, a partir de un espermatoцитo primario diploide se obtienen cuatro espermatidas haploides; b) *Espermioagénesis*, es el proceso mediante el cual las espermatidas se diferencian en espermatozoides altamente especializados (Engelhardt y Breves, 2005). Las características principales de la espermioagénesis incluyen formación del acrosoma a partir del aparato de Golgi, condensación y elongación del núcleo, formación del flagelo y una extensa pérdida de citoplasma y c) *Espermioación*, proceso en el cual las espermatidas se liberan a la superficie luminal de los túbulos seminíferos como espermatozoides (Cunningham, 2003).

En los caninos, la espermatogénesis tiene una duración de 8 a 9 semanas, pudiendo ser observados 4,5 ciclos epiteliales en los túbulos seminíferos. La duración del ciclo del epitelio seminífero en los caninos es de 13,8 días en promedio, siendo

dividido en 8 fases o estadios. El tránsito de los espermatozoides a lo largo del epidídimo es de 14 días en promedio (Foote *et al.*, 1972).

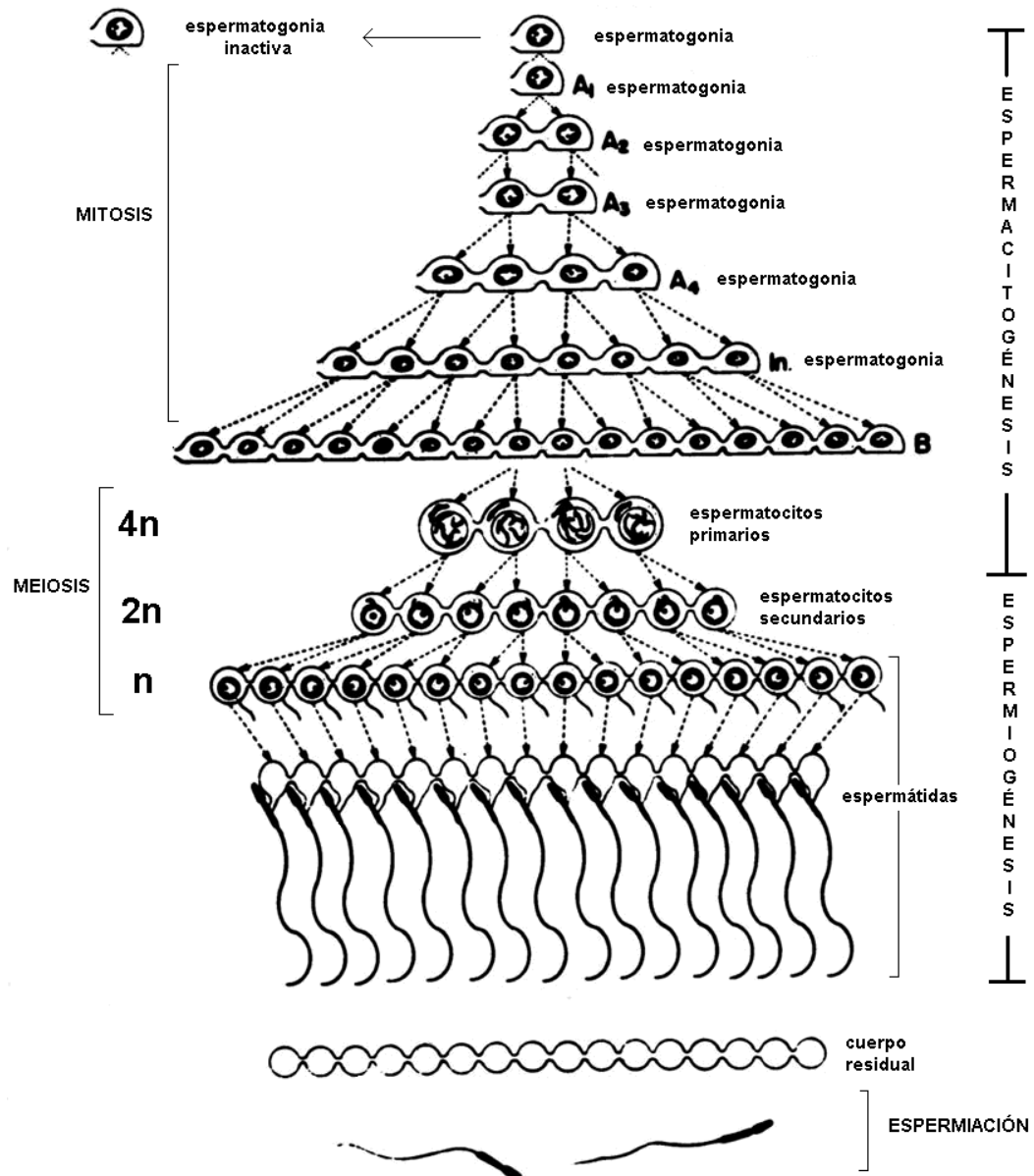


Figura 1. Representación esquemática de la espermatogénesis en caninos (Cunningham, 2003)

El macho canino parece no presentar influencia de la estacionalidad y es capaz de mantener su espermatogénesis y la función testicular a lo largo de todo el año (Taha *et al.*, 1981; Martins, 2005). Olar *et al.* (1983), sostienen que la producción diaria de espermatozoides en el perro está entre los 11,7 y 16,7 millones de espermatozoides por gramo de parénquima testicular. Los mismos autores sugieren que la frecuencia de eyaculación no afecta la producción diaria de espermatozoides, pero puede reducir las reservas ubicadas en la cola del epidídimo y el conducto deferente en hasta 26% después de 6 a 8 colectas de semen a la semana.

2.2. Características del semen canino

El semen canino está compuesto por dos partes: una parte celular conformada por los espermatozoides y una parte líquida llamado plasma seminal. La principal función del plasma seminal es servir como medio de transporte y sustentación para los espermatozoides (Wite, 1988); y, es el producto de los tejidos accesorios sexuales, como el epidídimo, el conducto deferente y la próstata, en respuesta a la testosterona (Wite, 1988; Parrish y First, 1993). Muchos estudios han cuestionado su importancia en el proceso de fecundación, ya que, en algunas especies, los espermatozoides del epidídimo son capaces de fecundar el ovocito, sin ningún contacto con el producto de secreción de la próstata. El plasma seminal puede no contener factores, extremadamente, esenciales para la fecundación, pero las secreciones pueden proporcionar condiciones favorables a la motilidad espermática, sobrevivencia y transporte de los espermatozoides, tanto en el tracto reproductor del macho, como en el de la hembra (Ewing y Chang, 1986).

El semen es eyaculado en tres fracciones (Johnston *et al.*, 2001). La primera fracción, o fracción pre-espermática, probablemente originada en la próstata, carece de espermatozoides cumpliendo una función profiláctica al despejar la uretra de posibles elementos indeseables (Aiello, 2000; Feldman y Nelson, 2000; Johnston *et al.*, 2001), su pH varía entre 6.2 a 6.5 y su volumen entre 2.4 ± 1.8 ml (Johnston, 1991; Silva *et al.*, 1996; Peña, 1997); la segunda fracción o fracción espermática es la de mayor importancia ya que contiene una concentración elevada de espermatozoides, estos provienen de la cola del epidídimo donde son almacenados (Aiello, 2000; Feldman y Nelson, 2000; Johnston *et al.*, 2001), su pH varía entre 6.3 a 6.6 y su volumen medio entre 0.5 a 3.5 ml (Gunzel-Apel, 1994); la tercera fracción o fracción prostática está constituida por el líquido prostático y es la que brinda el mayor volumen al eyaculado total (Aiello, 2000; Feldman y Nelson, 2000; Johnston *et al.*, 2001), su pH

oscila entre 6.5 y 7.0, el volumen es directamente proporcional a la actividad secretora de la glándula prostática y su media es de 6.48 ± 4.32 ml (Morton y Bruce, 1989; Aguiar *et al.*, 1994).

El volumen del eyaculado puede variar de 1 a 40 ml (Feldman y Nelson, 2000). La concentración normal de espermatozoides en un canino adulto es de 200 millones/ml hasta 1000 millones/ml, siendo las razas de mayor tamaño las que alcanzan los mayores valores (Feldman y Nelson, 2000; Aiello, 2000; Johnston *et al.*, 2001). Se debe de considerar que la concentración de espermatozoides en una colección depende de la cantidad de líquido prostático recogido (Aiello, 2000). Los valores normales de motilidad progresiva son de 75 a 80% (Aiello, 2000; Sánchez *et al.*, 2002; Feldman y Nelson, 2000), donde al menos un 75% de los espermatozoides deben ser normales en cuanto a su morfología (Feldman y Nelson, 2000). El pH normal del semen canino va de 6.3 a 6.7 y depende en gran parte, de la cantidad de líquido prostático obtenido al colectar (Feldman y Nelson, 2000).

2.3. Características del espermatozoide canino

El espermatozoide canino es una célula altamente diferenciada y especializada, cuya función en la propagación de la carga genética es establecida a través de la penetración y consecuente fecundación del ovocito (Rodriguez-Martinez *et al.*, 1993; Rodrigues, 1997).

El espermatozoide canino maduro (Fig. 2), tiene una longitud total de 61.4 ± 0.3 μm , la longitud de la cabeza es de 6.1 ± 0.04 μm y un ancho de 3.8 ± 0.2 μm , la pieza o segmento medio mide 10.1 ± 0.7 μm y la cola mide alrededor de las 50 μm (Woodall y Johnstone, 1988); básicamente, es una célula alargada cubierta enteramente por la membrana plasmática y conformada por una cabeza y una cola que contiene el motor celular necesario para la motilidad espermática (Garner y Hafez, 2002; Cunningham, 2003). La cabeza, como característica principal, posee un núcleo aplanado oval, que contiene cromatina muy compacta. La cromatina condensada consiste en un complejo formado por ácido desoxirribonucleico (DNA) y una clase especial de proteínas básicas llamadas protaminas espermáticas y va a contener un número cromosómico haploide, esto es, que va a poseer la mitad de cromosomas que existe en el núcleo de las células somáticas de la misma especie (Garner y Hafez, 2002; Ford, 2006). Sobre la cabeza se encuentra el acrosoma, que es una estructura que se establece durante las últimas etapas de la formación del espermatozoide, tiene forma de casquete y contiene acrosina, hialuronidasa y otras enzimas hidrolíticas necesarias para el

proceso de fecundación del ovocito (Garner y Hafez, 2002). La cola espermática está formada por el cuello y las piezas media, principal y caudal. El centro del segmento medio junto con toda la longitud de la cola, comprenden al axonema. El axonema, como tal, se compone de nueve pares de microtúbulos dispuestos radialmente alrededor de dos filamentos centrales. En la pieza media, ésta disposición 9 + 2 de los microtúbulos está rodeada, a su vez, por nueve fibras gruesas o densas las cuales están cubiertos de manera periférica por numerosas mitocondrias. La vaina mitocondrial, dispuesta en un patrón helicoidal alrededor de las fibras longitudinales, es la fuente de energía necesaria que permite el desplazamiento hacia delante y atrás de los microtúbulos del interior de la cola, produciéndose de esta manera la motilidad espermática (Garner y Hafez, 2002; Cunningham, 2003).

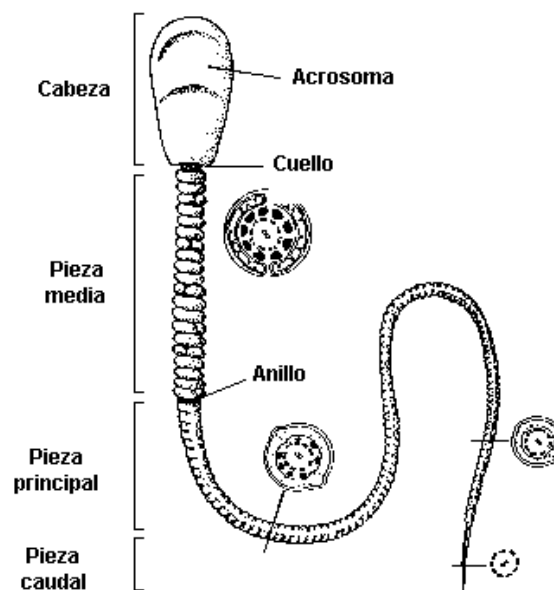


Figura 2. Características del espermatozoide canino (Garner y Hafez, 2002)

La membrana plasmática, que cubre enteramente a la célula espermática, toma forma de una bicapa lipídica desplegada con fosfolípidos y proteínas asociadas (Watson, 1995). En los espermatozoides, la bicapa fluida de la membrana lipídica actúa como una estructura altamente especializada, asumiendo un papel activo en la capacidad fecundante, recibiendo señales y modificándose a lo largo del proceso de

espermatogénesis, tránsito y almacenamiento en el epidídimo, eyaculación, depósito en el tracto genital de la hembra y, finalmente, en la capacitación y penetración del ovocito (Watson, 1995; Cunha, 2002).

Los espermatozoides, aunque carecen de varias de las organelas presentes en otras células, son metabólicamente activos; poseen las enzimas necesarias para realizar diversas reacciones bioquímicas, como la glucólisis (vía de Embden-Meyerhof), el ciclo del ácido tricarboxílico, la oxidación de ácidos grasos, el transporte de electrones (Garner y Hafez, 2002). Degradan glucosa, fructosa o manosa a ácido láctico cuando se encuentran en condiciones anaerobias. Esta actividad glucolítica, o más correctamente fructolítica, porque la fructosa es el principal azúcar del semen (250 mg/dl, comparado con 10 mg/dl de glucosa), permite a estos gametos sobrevivir en condiciones anaerobias. Esta característica es importante durante el almacenamiento de espermatozoides para su uso en inseminación artificial (Garner y Hafez, 2002). Utilizan una variedad de sustratos en presencia de oxígeno. Su actividad respiratoria es la que permite emplear el lactato o el piruvato resultantes del desdoblamiento de la fructosa, para la producción de dióxido de carbono y agua. Esta vía oxidativa, que se localiza en las mitocondrias, es mucho más efectiva que la fructólisis para producir energía. Por medio de estos procesos catabólicos, los espermatozoides convierten la mayor fracción de la energía en ATP. Aunque gran parte del ATP se emplea en el proceso consumidor de energía de la motilidad, otra parte se destina a mantener la integridad de los procesos de transporte activo de las membranas del espermatozoide, los cuales impiden la pérdida de componentes iónicos vitales de la célula espermática. En ausencia de sustratos exógenos, los espermatozoides utilizan sus reservas intracelulares de plasmalógeno como fuente de energía a corto plazo (Garner y Hafez, 2002).

El movimiento flagelar, como se mencionó anteriormente, constituye la mayor demanda energética del espermatozoide, pues para su locomoción debe superar la ineficiencia mecánica del flagelo, la resistencia ofrecida por las secreciones viscosas del tracto reproductivo de la hembra y la resistencia generada por la aglomeración de otros espermatozoides. El ATP generado en las mitocondrias de la pieza media se difunde a lo largo de la cola, mediante un tipo de difusión molecular. Los microtúbulos del axonema están compuestos por la tubulina, proteína dimérica de 110 kDa con 2 subunidades, α y β , asociadas a GTP y la dineína, proteína que constituye los brazos de las microfibrillas axonémicas, con características de ATPasa, Ca-Mg-dependiente. Existe también una proteína que une los pares de microtúbulos del axonema, la nexina, cuya función no está completamente esclarecida. Los movimientos progresivos

del espermatozoide son del tipo ondulatorio de atrás para adelante a lo largo del flagelo empujando al espermatozoide hacia adelante. Los movimientos corresponden a un deslizamiento de los filamentos. Esto es, las fibrillas del axonema no alteran su longitud, pero si se deslizan unas sobre otras, sin acortamiento. Durante los movimientos, los brazos de dineína, en cada par de túbulos forman un puente transitorio con el par adyacente, envolviendo sucesivas uniones y desuniones facilitadas por la hidrólisis del ATP, similar a lo que ocurre con la troponina en la contracción muscular (González, 2002).

2.4. Métodos de evaluación del semen canino

2.4.1. Evaluación macroscópica del semen

A. Volumen

El volumen del eyaculado es medido a través de la graduación en un tubo colector; y el cual puede variar de acuerdo con la edad, el tamaño del animal, la frecuencia, método y duración de la recolección y la cantidad de líquido prostático recolectado del perro (Feldman y Nelson, 2000).

El volumen normal va de 1 a 40 ml por eyaculado (Feldman y Nelson, 2000). Aguiar *et al.* (1994), citaron un valor de 5.98 ± 2.3 ml para eyaculado total de caninos de hasta 20 Kg.

B. Color

El color es medido por análisis subjetivo del semen. El color del eyaculado canino puede variar de blanco opalescente a opaco; esta variación depende de la concentración de espermatozoides en el semen (Feldman y Nelson, 2000).

El color amarillo de un eyaculado canino sugiere la presencia de orina; el color verde con o sin grumos, coágulos o escamas, es sugestiva de pus e infección del aparato reproductor; el color rojo sugiere la presencia de sangre, que generalmente es originada de heridas ocurridas en el pene erecto o de procesos patológicos de la glándula prostática. Un semen claro e incoloro sugiere azoospermia (Mies Filho, 1987; Christiansen, 1988; Feldman y Nelson, 2000). En general, cualquier color anormal debe alertar con respecto a la posibilidad de un problema y es necesario considerar el

estudio cuidadoso del aparato reproductor; ya que cualquier agente que modifique el color puede alterar la concentración, la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides (Feldman y Nelson, 2000).

C. pH

Para la evaluación del pH del semen canino, generalmente, se utilizan tiras reactivas para medir pH (Feldman y Nelson, 2000).

El pH normal del semen canino va de 6.3 a 6.7 y depende, en parte, de la cantidad de líquido prostático obtenido el cual tiene un pH promedio de 6.8. Se cree que la naturaleza alcalina del líquido prostático favorece el aumento de la motilidad espermática y la neutralización del ambiente ácido de la cúpula vaginal durante la cópula. Un aumento en el pH del semen se vincula con una eyaculación incompleta o inflamación de testículos, epidídimos o próstata (Feldman y Nelson, 2000).

2.4.2. Evaluación microscópica del semen

A. Motilidad

La evaluación de la motilidad espermática es el parámetro más utilizado para la evaluación del semen, y es definida como el porcentaje de espermatozoides móviles de la muestra evaluada inmediatamente después de la recolección o después de la criopreservación del semen (Seager y Fletcher, 1972). La proporción de espermatozoides, exhibiendo motilidad total y progresiva, es generalmente estimada subjetivamente, colocándose una gota de semen sobre una lámina limpia previamente entibiada (35-37°C), y cubierta por un cubreobjetos en el microscopio óptico a 400X; el resultado obtenido debe ser expresado en porcentajes (0-100). La motilidad progresiva es considerada normal en semen canino y refleja la viabilidad y capacidad de fecundar al ovocito; una muestra normal de semen debe tener más del 70% de los espermatozoides con motilidad vigorosa de avance (Feldman y Nelson, 2000).

Actualmente, se han desarrollado varios procedimientos para la evaluación objetiva (no sesgada) de la motilidad espermática, como la fotomicrografía de tiempo, la reproducción de videomicrografía cuadro por cuadro, la espectrofotometría y el análisis computarizado. Aunque los sistemas automatizados son precisos, su costo relativamente elevado limita su uso de rutina (Ax *et al.*, 2002).

B. Concentración

La concentración de una muestra de semen es determinada, generalmente, a través del conteo manual de las células espermáticas en la Cámara de Neubauer, después de la dilución de 1:50 en agua; pese a que este método puede tomar mucho tiempo, es muy exacto (Feldman y Nelson, 2000; Ax *et al.*, 2002). La concentración o número de espermatozoides por eyaculado se determina al multiplicar el número de espermatozoides por mililitro de semen por el volumen total (en mililitros) del recolectado, que en el perro adulto normal es de 200 millones hasta más de 1000 millones (Feldman y Nelson, 2000). No obstante este método puede reemplazarse por un espectrofotómetro o colorímetro calibrado, instrumentos que tienen la ventaja de ser precisos y rápidos; sin embargo, los fotómetros no son exactos en caso de semen contaminado, y si se agregan dilutores turbios antes de calcular la concentración puede confundir los resultados (Ax *et al.*, 2002).

C. Morfología

La morfología espermática es un parámetro indispensable en la evaluación del semen, pues está intrínsecamente implicada a problemas de fertilidad tanto en la especie canina como en otras especies animales (Oettlé, 1993). La metodología generalmente utilizada para la evaluación de la morfología espermática es la coloración de frotis de semen (Feldman y Nelson, 2000). Los colorantes Wright, Rosa de Bengala, Diff-Quik, Spermac® (Purswell *et al.*, 1992; Oettlé y Soley, 1985; Ström *et al.*, 1997), Giemsa (Cardoso *et al.*, 2003), Hematoxilina-eosina (Silva *et al.*, 2003a) y eosina-nigrosina (Peña, 2000) son comúnmente utilizados. Después de la coloración, los frotis deben ser evaluados en microscopio mediante inmersión en aceite. Se valoran los espermatozoides individuales en cuanto a anomalías que ocurren en la cabeza, pieza media y cola; y las cuales pueden subclasificarse en primarias y secundarias. Se cree que las anomalías primarias representan alteraciones de la espermatogénesis (es decir, dentro de los testículos), en tanto que las anomalías secundarias son inespecíficas y pueden ocurrir durante el tránsito por el sistema de conductos (es decir, dentro del epidídimo), durante el manejo del semen o después de infecciones, traumatismos o fiebre. Se deben contabilizar y clasificar un mínimo de 200 espermatozoides; los machos normales suelen tener más del 70% de espermatozoides con morfología normal, las anormalidades primarias deben constituir menos del 10% y las secundarias menos del 20% de los espermatozoides defectuosos

en el perro normal (Feldman y Nelson, 2000). Oettlé (1993) relató que a medida que aumenta el porcentaje de espermatozoides anormales, la fertilidad es reducida, observando que cuando la proporción de espermatozoides morfológicamente normales se encontraba por debajo del 60%, la fertilidad se encontraba adversamente afectada.

D. Integridad funcional de membrana

El mantenimiento de la integridad de la membrana es de fundamental importancia para que una célula espermática finalice su función primordial que es la fecundación (Cunha, 2008). La membrana de una célula espermática intacta realiza el transporte selectivo de fluidos, hasta en condiciones de hiposmolaridad; en este caso, estas condiciones, permiten el pasaje de agua por la membrana celular hasta el restablecimiento del equilibrio osmótico entre los fluidos extra e intracelulares (Santos *et al.*, 2001); con el flujo de agua hacia el interior de la célula, se produce un aumento del volumen celular (hinchazón), con posterior doblamiento de la cola (Jeyendran *et al.*, 1984). Este mecanismo simple de defensa de la célula espermática generó un método de evaluación de la integridad de las membranas celulares denominado test hiposmótico (HOST) (Jeyendran *et al.*, 1984; Kumi-Diaka, 1993), el cual fue originalmente elaborado para su uso en espermatozoides humanos, con la finalidad de evaluar la actividad bioquímica de la membrana espermática intacta (Jeyendran *et al.*, 1984). Sin embargo, el HOST ha sido utilizado como protocolo de evaluación de la viabilidad funcional de la membrana espermática de diversas especies: humanos (Jeyendran *et al.*, 1984), equinos (Alves *et al.*, 2004), caninos (Kumi-Diaka, 1993; Sánchez *et al.*, 2002), ovinos (Oberst *et al.*, 2003) y caprinos (Salgueiro *et al.*, 2003). Jeyendran *et al.* (1984), al describir la utilización de la técnica para evaluación del espermatozoide humano, probaron soluciones con osmolaridad que varían de 50 a 300 mOsmol, obteniendo mejores índices de reacción espermática al test al utilizar soluciones de 150 mOsmol/L, o menos; a su vez, los mismos autores probaron diferentes solutos y asociaciones entre ellos, obteniendo mejores resultados con la utilización de la asociación entre citrato de sodio y fructosa a 150 mOsmol/L, incubada por 30 minutos a 37°C, razón por la cual escogieron este protocolo como patrón para experimentos a futuro. Estudios han demostrado la correlación que existe entre el HOST y la motilidad espermática del semen canino congelado (Kumi-Diaka, 1993). A pesar de ser un test relativamente nuevo para evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide, el HOST debe ser considerado como un

indicador de fertilidad, ya que la viabilidad de la membrana es un requisito básico para que ocurra la fecundación (Melo, 1999). Para la realización del HOST, los espermatozoides son incubados en una solución hiposmótica (150mOsm) por 1 hora a 37°C. Posteriormente, se evalúan 200 espermatozoides, bajo el microscopio, en cuanto a su morfología; las células espermáticas íntegras presentan enrollamiento de las colas, los cuales son clasificados como reactivos; el resultado se expresa en porcentajes (%) (Kumi-Diaka, 1993); los valores normales en una muestra de semen fresco se encuentra en el rango de 80 a 96% de células con membrana íntegra (Sánchez *et al.*, 2002).

2.5. Criopreservación del semen canino

La criopreservación es el proceso en el cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre -80°C y -196°C, para detener las funciones vitales de una célula o un organismo y poderlo mantener en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo; a esas temperaturas, cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que producirían la muerte de una célula, quedan efectivamente interrumpidas (Woods *et al.*, 2004)

La congelación en nitrógeno líquido es la técnica más utilizada para congelar y conservar semen canino durante largos periodos de tiempo (Olar *et al.*, 1989; Hay *et al.*, 1997; Peña y Linde-Forsberg, 2000b). Esta técnica ofrece innumerables ventajas, las cuales incluyen, principalmente, la posibilidad de transporte del semen para largas distancias y su almacenamiento por tiempo indeterminado. Adicionalmente, permite la disminución de gastos, que ocurren por la necesidad de exportación de un animal, se evita el envío de la hembra para el lugar donde se encuentra el macho, lo que es un procedimiento desgastante y puede repercutir negativamente en la eficiencia reproductiva de la hembra, además de los riesgos sanitarios que conlleva el apareamiento natural (Linde-Forsberg y Forsberg, 1989).

2.5.1. Dilutores del semen canino

Tanto para la refrigeración como para la congelación del semen, son utilizados dilutores con el propósito de proteger a los espermatozoides de todos los efectos críticos del proceso de congelación. De este modo, se hace necesario el uso de un buen dilutor el cual debe realizar las siguientes funciones: a) contener nutrientes como

una reserva de energía, b) proteger contra el efecto nocivo del enfriamiento rápido, c) servir como tampón ajustando las alteraciones del pH, d) promover una presión osmótica y concentración de electrolitos dentro de lo normal, e) incrementar el volumen del semen de modo que éste pueda emplearse para múltiples inseminaciones y g) poseer crioprotectores que reduzcan los daños a las células espermáticas durante la congelación y posterior descongelación (Concannon y Batista, 1989; Háfiez, 2002).

Los primeros estudios para la preservación de semen canino por periodos cortos o largos, se iniciaron con la adaptación empírica de dilutores usados para la refrigeración y congelación de semen bovino. Tales dilutores eran compuestos por tampones a base de leche desnatada, fosfato-glucosa, citrato, lactosa, Tris y Tris-fructosa-ácido cítrico (Farstad, 1996). Actualmente, la mayoría de los investigadores que trabajan en criopreservación de semen canino emplean dilutores a base de Tris/ácido cítrico como agente tampón, glucosa o fructosa como fuentes de energía, yema de huevo como protector de enfriamiento y el glicerol como agente crioprotector (Bateman, 2001; Verstegen *et al.*, 2005; Peña *et al.*, 2006; Hermansson y Forsberg, 2006; Alhaider y Watson, 2008).

A. Tris

El compuesto Tris (Tris-hidroximetil-aminometano) ($C_4H_{11}NO_3$), es una sustancia soluble en agua, de aspecto cristalino, con un peso molecular de 121.14 g/L; tal sustancia posee la cualidad de formar soluciones acuosas y sistemas reguladores de la concentración de iones de hidrógeno, y por su capacidad amortiguadora, tiene la capacidad de neutralizar los productos de desecho resultantes del metabolismo de los espermatozoides, y en particular al ácido láctico (Salamon y Maxwell, 1995) además, actúa en la reducción del metabolismo de la fructosa por la célula espermática, contribuyendo así en la preservación de su energía (Rodrigues, 1997).

Para la preparación del dilutor Tris, usualmente, se realiza la adición de una hexosa ($C_6H_{12}O_6$), como fuente exógena de sustrato energético para el espermatozoide (England, 1993), así como componente osmótico y agente crioprotector (Farstad, 1996; Peña, 1997; Holt, 2000a; Johnston *et al.*, 2001). La célula espermática de los mamíferos es capaz de obtener energía necesaria para la manutención de su motilidad a través de la vía glucolítica o del ciclo de Krebs (Rigau *et al.*, 2002); sin embargo, el plasma seminal de la especie canina, normalmente, no posee grandes cantidades de fructosa y glucosa (Rigau *et al.*, 2001). Por lo tanto, estos son los azúcares más comúnmente utilizados para la preparación del dilutor Tris (Silva

et al., 2002; Martins, 2005). Algunos di y trisacáridos, no metabolizables por los espermatozoides, también han sido utilizados en dilutores para congelación de semen en diferentes especies, ya que ejercen un efecto crioprotector en función de su alto peso molecular, contribuyendo con el equilibrio osmótico (Salisbury y Vandemark, 1978). Además, los azúcares, también, ejercen este efecto crioprotector interactuando directamente con la membrana previniendo los daños causados por la deshidratación extrema que puede ocurrir con la descongelación, al restaurar la cantidad de agua alrededor de los grupos polares de la cabeza de los fosfolípidos (Holt, 2000a).

B. Ácido cítrico

El ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico) ($C_6H_8O_7$) es un ácido frágil inorgánico, fácilmente encontrado en los frutos cítricos, que también entra en la composición del dilutor Tris (Silva *et al.*, 2002). En temperatura ambiente, se presenta como un polvo blanco, pudiendo existir en la forma anhidra o en la monohidratada; en el caso del dilutor Tris, la forma utilizada es la monohidratada (Silva *et al.*, 2002). Por su conocida acción antioxidante, el ácido cítrico ha sido utilizado como un conservante natural. En bioquímica es marcada su actuación en el ciclo de Krebs, importante vía de la respiración celular que ocurre en la mitocondrias. En algunas soluciones, el ácido cítrico es capaz de servir como donador de protones, produciendo el citrato, que es largamente conocido por actuar en la estabilización de pH. Así, es probable que el ácido cítrico contribuya para la preservación de la célula espermática auxiliando en la manutención del pH y actuando como antioxidante (Silva, 2005).

C. Yema de huevo

La yema de huevo de gallina ha sido adicionada a los dilutores del semen para proteger la membrana plasmática, restaurando los fosfolípidos perdidos durante el choque térmico originado del cambio de temperatura que ocurre durante el enfriamiento inicial del semen (Hammerstedt *et al.*, 1990). Se considera que la protección conferida por la yema puede ser debido a la presencia de una lipoproteína llamada fosfatidilcolina, la cual interactúa con la estructura lipídica de la membrana plasmática de las células espermáticas y propician la protección (Bouchard *et al.*, 1990). Según Foulkes (1977), la yema de huevo previene también la liberación de la enzima hialuronidasa por la célula espermática. Además de proteger la membrana

plasmática, la yema de huevo actúa como una fuente proteica para el dilutor (Santos, 2004). La mayoría de los autores utilizan concentraciones de yema en torno de 20% en el dilutor (Farstad y Andersen-Berg, 1989; Linde-Forsberg y Forsberg, 1989; Martins, 2005; Silva, 2005).

A pesar de sus efectos benéficos, la yema presenta algunos inconvenientes, como la posibilidad de transmisión de enfermedades (Silva *et al.*, 2002). Además, puede facilitar el proceso de oxidación sobre los espermatozoides caninos, pudiendo promover la peroxidación de los lípidos insaturados, a la cual el espermatozoide canino es bastante sensible (Rodrigues, 1997).

D. Glicerol

Para la criopreservación de semen, se hace necesaria la adición de sustancias denominadas crioprotectores, cuya presencia es capaz de mejorar la sobrevivencia celular después de los procesos de congelación y descongelación. Los agentes crioprotectores pertenecen a dos grupos: 1) aquellos que penetran en las células, como el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO), el etilenglicol y el metanol; y 2) aquellos que permanecen en el medio extracelular, como las proteínas, los azúcares y el polivinil-pirrolidona (England, 1993).

El glicerol ($\text{CH}_3\text{H}_8\text{O}_3$), un alcohol polihídrico altamente permeable con peso molecular 92,10g/L, es el crioprotector más empleado en la congelación de semen en las diferentes especies (Silva *et al.*, 2003b). La adición de glicerol a los dilutores reduce substancialmente las injurias de la criopreservación; sin embargo, esta adición y su remoción, también causan alteraciones en las células espermáticas (Fahy, 1986; Parks y Graham, 1992; Gao *et al.*, 1993; Watson, 1995; Rota, 1998). El glicerol es osmóticamente activo, y su adición temporal produce cambios en el volumen y pérdida de agua en la célula; altera las propiedades coligativas del agua, bajando el punto de congelación y estableciendo un mayor tiempo para la salida de agua de la célula antes de la congelación y formación de cristales de hielo, que pueden modificar las organelas intracelulares (Hammerstedt *et al.*, 1990; Watson, 1995).

Curry (2000) y Holt (2000b) reportaron que el glicerol ejerce efectos tóxicos sobre los espermatozoides, como alteraciones físico-químicas que pueden llevar a la ruptura de la membrana plasmática, a la remoción de importantes proteínas de la membrana, u originar daños del acrosoma. El glicerol puede provocar alteraciones de las propiedades de la membrana celular a través de la inducción de modificaciones en la estabilidad de su estructura lipídica y alteraciones en la permeabilidad al agua.

Los agentes crioprotectores penetrantes, particularmente el glicerol, protegen la célula de la crioinjuria durante la fase de cristalización que ocurre entre -6° y -10°C. De esa forma, no parecería ser lógico adicionar el glicerol a temperaturas superiores a 30°C (Colas, 1975). Pero, ya fue demostrado que el glicerol podría ser adicionado al semen canino a 37 °C (Peña *et al.*, 1998), a 27° C y a 4°C (Silva *et al.*, 2006ab). Tal adición podría ser realizada sea en la forma única o fraccionada (Silva *et al.*, 2003b), siendo la adición única la más indicada por conferir más practicidad al proceso; al respecto, Carlotto (2009) evaluó el efecto del momento de adición del glicerol (inicio, inicio y final, final) durante la curva de enfriamiento sobre la calidad espermática durante el proceso de criopreservación de semen canino; a pesar de no encontrar diferencias estadísticas, observó que la adición de glicerol al inicio de la curva de enfriamiento proporciona ligeramente un mejor rendimiento espermático después del proceso de congelación/descongelación que en los otros momentos de adición.

2.5.2. Procesamiento del semen canino

A. Dilución

Varios trabajos en tecnología de semen canino emplean diluciones basadas en una concentración espermática pre fijada en el orden de 100 (Tsutsui *et al.*, 2000), 200 (Sirivaidyapong *et al.*, 2001), 400 y 800 x 10⁶ de espermatozoides/ml (Peña y Linde-Forsberg, 2000b). Esa dilución posibilita calcular el número de espermatozoides por pajilla y determinar la exacta proporción entre el dilutor y las células espermáticas.

Por otro lado, otros estudios han utilizado diluciones basadas en la proporción de un volumen fijo, entre una parte de semen y una parte de dilutor (Cardoso *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003b), dos parte de dilutor (Silva y Verstegen, 1995), tres partes de dilutor (Yildiz *et al.*, 2000), y hasta cuatro partes de dilutor (England y Ponzio, 1996). Según este método de dilución, el semen canino podría ser eficientemente diluido en Tris, proporcionando más practicidad al procedimiento, ya que no existe la necesidad de contar los espermatozoides, reduciendo el tiempo y los costos desarrollados por la congelación del semen (Silva *et al.*, 2005; Silva, 2007).

Sin embargo, una dilución excesiva podría llevar a una pérdida permanente de la motilidad, de la actividad metabólica y de la capacidad fecundante de la célula espermática (Mann, 1964). Las proteínas del plasma seminal son importantes para la manutención de la viabilidad seminal de ovinos, previniendo los daños originados del

choque térmico sobre la membrana espermática (Pérez-Pé *et al.*, 2001). A partir de este conocimiento, es posible que una dilución excesiva minimice los efectos benéficos de sustancias presentes de los fluidos testiculares y epididimarios que componen la fracción espermática del semen de caninos (Silva, 2007).

B. Envasado

La tasa de congelación usada en la criopreservación de semen canino varía ampliamente, y son dependientes del método de envasado. Por lo general, los espermatozoides caninos son congelados en pajillas de plástico de 0,5ml (Olar *et al.*, 1989; Rota, 1998; Feldman y Nelson, 2000); las cuales proporcionan un medio conveniente para el manejo, rotulado, almacenamiento y descongelación. Otros modelos alternativos incluyen volúmenes de semen sellado en ampollitas y semen congelado en pequeñas píldoras esféricas o pellets en un bloque de hielo seco (Ivanova-Kicheva *et al.*, 1995; Feldman y Nelson, 2000).

La comparación directa entre pellets y pajillas en el método de congelación, no muestra diferencia en la calidad del semen canino después de la descongelación (England, 1993); sin embargo, la congelación en pajillas tienen la ventaja sobre los pellets en facilitar la identificación del donador de semen y reducir la posibilidad de contaminación, que se torna importante con el movimiento de semen congelado a diferentes lugares (Farstad, 1996).

C. Congelación

Diversas metodologías han sido descritas para la congelación de semen canino, las cuales varían de acuerdo con el tipo dilutor, protectores de enfriamiento y agentes crioprotectores empleados, destacando el uso de diferentes velocidades de congelación. En todas, se busca minimizar el daño causado al espermatozoide por el procesamiento, a fin de recuperar un máximo posible de espermatozoides viables (Strom *et al.*, 1997).

El método de congelación de semen canino más usado es aquel descrito por Andersen en 1975. En este método, se realiza la dilución del semen a 37°C con dilutor Tris, yema de huevo y glicerol. En seguida, se procede a un periodo de equilibrio de tres horas, seguido del envase en pajillas plásticas y a la exposición a los vapores de nitrógeno para la congelación. Actualmente, este método ha servido como base para innumerables trabajos donde han sido realizadas pequeñas modificaciones,

alcanzando excelentes resultados *in vitro* (Rota *et al.*, 2006) e *in vivo* (Thomassen *et al.*, 2006). Martins (2005) y Chirinéa *et al.* (2006) realizaron la dilución a 37°C, inmediatamente seguida del envase en pajillas de 0.5 ml; luego transfirieron las muestras a un refrigerador programado a 5°C por una hora y, finalmente, expusieron las pajillas al vapor de nitrógeno por 20 minutos, siendo el semen almacenado en termo criogénico.

En el 2000, Silva *et al.* adaptaron la metodología de congelación del semen de caprinos con el dilutor a base de agua de coco (Nunes *et al.*, 1997) para la congelación del semen canino con el dilutor Tris. Este método consistió en hacer una primera dilución, sin glicerol, a 37°C, seguido de un periodo de enfriamiento hasta que la muestra alcanzase los 4°C, donde fue realizado la segunda dilución, la cual contenía el doble de la concentración final de glicerol deseada, y el envase en pajillas de 0,5 ml. Luego, se expusieron las pajillas a vapores de nitrógeno a -60°C por 5 minutos y el acondicionamiento en tanque criobiológico a -196°C. Estos autores observaron que este método es de gran practicidad y es más rápido que el método de Andersen, por no requerir un tiempo de equilibrio después de la adición de glicerol. En el 2006a, los mismos autores demostraron que el semen canino diluido en Tris y congelado a través de este método es capaz de mantener su capacidad de fertilización *in vitro*, siendo observada una tasa de 72,7% de interacciones entre espermatozoides descongelados y oocitos homólogos.

Actualmente, un factor de importancia en el estudio de los métodos de congelación del semen ha sido el uso de diferentes equipamientos para bajar la temperatura, como: tanques de congelación (Peña y Linde-Forsberg, 2000a), ultra-freezers (Álamo *et al.*, 2005; Batista *et al.*, 2006) y maquinas computarizadas de congelación (Rota *et al.*, 2005; Schafer-Somi *et al.*, 2006). Estos equipamientos han mostrado mejores resultados que los métodos convencionales que utilizan la exposición directa a los vapores de nitrógeno, pues impiden la ocurrencia de oscilaciones térmicas durante la congelación, posibilitando una mejora en los resultados después de la descongelación (Silva, 2007).

D. Descongelación

El proceso de descongelación parece ser tan dañino para los espermatozoides como la congelación y los principales efectos adversos son atribuidos a la recrystalización de microcristales de hielo intracelular, cuando la congelación es realizada lentamente; o debido a alteraciones bruscas del volumen celular, cuando la

descongelación se da muy rápidamente; además de alteraciones de estructura y función de la membrana plasmática (Watson 1995; Holt 2000a).

Así como en la congelación, existen diferentes protocolos de descongelación para el semen, destacando el uso de diferentes temperaturas y velocidades. En la literatura, este proceso generalmente es realizado sumergiendo las pajillas de semen en baño maría a temperaturas que varían de 1°C (Olar *et al.*, 1989), pasando por 30°C a 37°C (Olar *et al.*, 1989; Ström *et al.*, 1997) hasta 70°C a 75°C (Olar *et al.*, 1989; Ström *et al.*, 1997; Schafer-Somi *et al.*, 2006).

Olar *et al.* (1989), compararon tres temperaturas de descongelación (1°C por 120s, 35°C por 30s y 75°C por 12s), y observaron que la descongelación rápida (75°C) fue superior a la descongelación lenta (1°C y 35°C), pero que entre estas últimas no hubo diferencia significativa. Resultados similares fueron encontrados por Peña y Linde-Forsberg (2000b), Ström *et al.* (1997) y Rota *et al.* (1998) que relataron la superioridad de la descongelación a 70°C sobre la de 37°C. Contrariamente, Silva *et al.* (1998) concluyeron que la temperatura de 37°C por 60s preserva más eficazmente la calidad del semen canino que a 50°C por 8s. Por otro lado, Ivanova-Kicheva *et al.* (1997) observaron una mayor efectividad de la temperatura a 55°C por 5s para la viabilidad espermática que a 37°C por 8s.

De un modo general, la elección de la tasa de descongelación debe relacionarse con la tasa de congelación para la sobrevivencia óptima de las células espermáticas (Hammerstedt *et al.*, 1990), esto quiere decir, que si la congelación fue realizada de manera rápida, así debe ser realizada la descongelación, y si la congelación fue realizada de forma lenta, también debe ser lenta la descongelación (Ström *et al.*, 1997). Actualmente, las temperaturas más empleadas para la descongelación del semen canino envasado en pajillas han sido las de 37° y 75°C (Oga, 2008).

2.5.3. Efecto de la criopreservación sobre la función espermática del semen canino

El enfriamiento lleva a la célula a un estado de quiescencia, reduciendo el metabolismo y proporcionando una disminución en los gastos energéticos y en la producción de catabólicos tóxicos, contribuyendo, así, a la preservación celular. De la misma manera que la congelación puede disminuir o paralizar algunas reacciones

bioquímicas celulares, ella puede, también, acelerar otras, originando daños o la muerte celular (Mazur *et al.*, 1972; Watson, 1981; Watson, 1995; Holt, 2000a).

El termino estrés térmico o choque térmico define un conjunto de alteraciones ocurridas en los espermatozoides de los mamíferos cuando, al ser enfriados rápidamente, de la temperatura corpórea hasta temperaturas próximas a 5°C, tiene como consecuencia una disminución irreversible de la motilidad espermática, cambios en la bioquímica y en el funcionamiento de las células espermáticas incluyendo: disminución de la tasa de la glucólisis, de la respiración celular y de la fructólisis, aumento en la degeneración del ácido desoxirribonucleico y liberación de material intracelular (Amann y Graham, 1993; Jasko, 1994; Zúccari, 1998; Holt, 2000a; Watson, 2000). La mayoría de las alteraciones causada por el estrés térmico se inicia en la membrana espermática (Jasko, 1994; Holt, 2000a), ya que, la alteración de la temperatura pueden determinar cambios en la estructura y organización de la bicapa de fosfolípidos (Gennis, 1989), la reducción de la temperatura puede llevar a un reordenamiento de algunos fosfolípidos dentro de la bicapa; con este reordenamiento las propiedades básicas de la membrana biológica, como permeabilidad selectiva y difusión lateral de proteínas, no serían mantenidas alterando, así, la funcionalidad de la membrana en cuestión (Watson, 1981; Gennis, 1989; Parks y Graham, 1992; Amann y Graham, 1993; Jasko, 1994; Watson, 1995; Holt, 2000a; Watson, 2000). Otros elementos de la bicapa de fosfolípidos pueden también ser extremadamente afectados por la caída de la temperatura, un ejemplo de esto sería la movilidad de las proteínas integrales que podría ser restringida por el efecto de la fase transicional de los lípidos, lo que llevará a una alteración en sus actividades, especialmente en aquellas proteínas dependientes de su modulación estructural para la manutención de sus funciones, como es el caso de las proteínas formadoras de los canales iónicos (Watson, 2000). La regulación de la entrada de calcio es claramente afectada por el enfriamiento, siendo indiscutiblemente, una de las más graves alteraciones en términos de la función espermática, y, en algunos casos, esta alteración puede ser incompatible con la viabilidad espermática. La entrada de calcio en la célula durante el enfriamiento, imitando lo que ocurre fisiológicamente durante la capacitación, contribuye al inicio de las reacciones fusogénicas entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa (Cunha, 2002). Watson (2000) relató la existencia de una gran similitud entre los daños verificados en la membrana plasmática durante la congelación y las alteraciones verificadas después de la reacción del acrosoma, este autor consideró una la versión desorganizada de la otra, ya que según esta revisión, existen algunos elementos del citoesqueleto espermático sensibles a alteraciones de

temperatura, como es el caso de los filamentos de actina. El mismo autor relató que la despolimerización de la F-actina es una de las etapas necesarias para permitir la aproximación de la membrana plasmática y de la membrana acrosomal externa, promoviendo la exocitosis acrosomal y que, tal vez, esta pueda ser una de las alteraciones para la fusión desorganizada de las membranas después del enfriamiento y la criopreservación de los espermatozoides.

Con el declino constante de la temperatura, las células estarán expuestas a temperatura de congelación (debajo de 0°C), y con esto, las células espermáticas serán expuestas a alteraciones de osmolaridad del medio que las circunda. El agua presente en el medio extracelular se encuentra bajo la forma de solución, con la congelación de parte de esta agua, la saturación de solutos aumenta, volviéndose el medio externo hipertónico. En este momento, para que un equilibrio osmótico sea alcanzado, ocurre la salida de agua, para el medio externo, de la célula al ser congelada. Esta tentativa de la célula en equilibrar el medio que la circunda puede llevarla a sufrir un efecto deletéreo debido a la gran deshidratación y a la exposición de un medio extremadamente saturado. Este efecto es llamado efecto de solución y es considerado uno de los puntos críticos en el proceso de congelación de las células espermáticas (Mazur *et al.*, 1972; Watson, 1981; Watson, 1995; Holt, 2000a).

Uno de los aspectos de mayor cuestionamiento dentro de los estudios de criopreservación es saber cuando las alteraciones ocurre, si durante el congelamiento o si en el descongelamiento. Existen evidencias sugestivas de que células congeladas pueden ser dañadas en la descongelación y este efecto ha sido atribuido, principalmente, a la recristalización de los microcristales durante una descongelación inapropiada (Watson, 1995).

2.6. Recuperación y criopreservación de espermatozoides epididimarios caninos

2.6.1. El epidídimo: Estructura y función

El epidídimo (Fig. 3) es un conducto sinuoso, único y de gran longitud (5 a 8 metros) dispuesto a lo largo del borde medial del testículo, y que se divide anatómicamente en tres segmentos: cabeza o *caput*, cuerpo o *corpus*, y cola o *cauda* (Agüera, 1995; Cunningham, 2003). Cumple esencialmente tres funciones: sirve para el transporte de los espermatozoides y es responsable de su maduración; a la vez,

constituye una reserva de espermatozoides. Mientras que los procesos de maduración se realizan preferentemente en la cabeza y cuerpo del epidídimo, la cola sirve esencialmente como órgano de reserva de los espermatozoides maduros. Solamente para el transporte a lo largo del epidídimo se necesitan entre 10 y 14 días (Engelhardt y Breves, 2005).

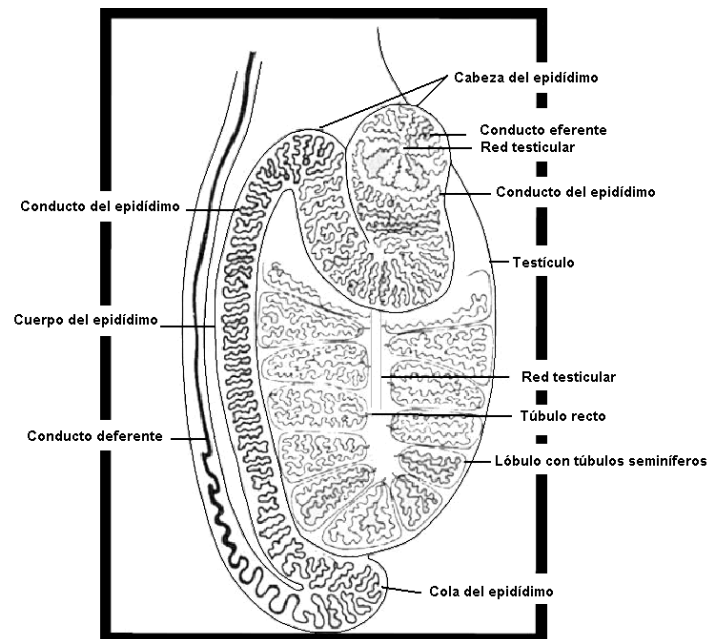


Figura 3. Dibujo esquemático del sistema tubular del epidídimo y testículo del canino (Garner y Hafez, 2002)

Cuando los espermatozoides abandonan el epitelio germinal están sumamente diferenciados y son transportados mediante el flujo de secreción y el peristaltismo de los canalículos testiculares, a lo largo de la red testicular y los conductos eferentes (13) hasta llegar al epidídimo (Engelhardt y Breves, 2005). Los espermatozoides que entran en la cabeza del epidídimo son inmóviles e inviables y sólo alcanzan la motilidad y capacidad para fecundar tras experimentar el proceso de migración y maduración a lo largo de la cabeza y del cuerpo del epidídimo; ya que éste proporciona un medio adecuado para que esos procesos se realicen (Cunningham, 2003). La cola del epidídimo y el conducto deferente constituyen un punto de almacenamiento de espermatozoides maduros y se conocen como reservas extragonadales de espermatozoides (Cunningham, 2003).

El líquido del epidídimo se compone en parte de los productos de secreción de las células de Sertoli que abandonan los túbulos seminíferos junto con los espermatozoides. Estos productos de secreción también constituyen la fuente nutritiva de los espermatozoides; su síntesis y secreción es estimulada por la FSH en presencia de testosterona. La producción de líquido es continua y la corriente que se produce provoca que los espermatozoides fluyan por los túbulos testiculares en dirección hacia el epidídimo. En el epidídimo, la secreción de las células de Sertoli se modifica gracias a la actividad de absorción y secreción del epitelio, de manera que la composición del fluido varía continuamente en las distintas secciones del epidídimo. Además de proteínas y lípidos, el fluido epididimario contiene concentraciones elevadas de andrógenos, especialmente dihidrotestosterona: ya que la absorción y secreción por parte del epitelio epididimario, así como la maduración de los espermatozoides, solamente puede desarrollarse en presencia de andrógenos (Engelhardt y Breves, 2005).

Los mecanismos de maduración y las medidas de protección que de ellas se derivan para los espermatozoides son extremadamente complicados y todavía no se han aclarado por completo. En el curso del paso a través del epidídimo se produce una estabilización de las estructuras de la cola y del núcleo gracias a la formación de puentes disulfuro, y ciertas modificaciones del metabolismo. Una de las características más importantes de la maduración es la modificación funcional de la membrana plasmática del espermatozoide. Debido a la acción recíproca de los productos de secreción de las diversas secciones del epidídimo se produce una maduración escalonada de las superficies del espermatozoide al descubierto. Durante este procesado se eliminan algunas sustancias adheridas al espermatozoide cuando se encontraba en el testículo, o se modifican algunas glucoproteínas de la membrana mediante enzimas del epidídimo, como proteasas, glucosidasas y glucosiltransferasas. Otras proteínas del epidídimo se integran en la membrana (proteínas de membrana integradas) o se unen a la superficie del espermatozoide (proteínas de membrana periférica). También la doble capa lipídica modifica su composición y la distribución de sus componentes, algunas proteínas de membrana se distribuyen completamente por el interior de la membrana plasmática. Esta redistribución de proteínas y la modificación de la doble capa lipídica contribuyen a la formación de la estructura de dominios típica de la membrana plasmática de un espermatozoide maduro. La maduración de la membrana plasmática es esencialmente la responsable de la motilidad, identificación del ovocito y del resto de las funciones que el espermatozoide requiere para fecundar (Engelhardt y Breves, 2005).

La barrera hemato-epididimaria protege a los espermatozoides del sistema inmunitario propio, igual que la barrera hemato-testicular. Además hay otras medidas de protección, como la inclusión de colesterol en la membrana plasmática del espermatozoide contribuye a la estabilización de la misma. Este efecto se refuerza con una capa protectora de proteínas que enmascara las proteínas funcionales de la superficie del espermatozoide, como por ejemplo, los receptores del ovocito o los canales iónicos, a la vez que evita su destrucción por proteólisis. De igual manera, el epidídimo ha desarrollado sus propios mecanismos para proteger al espermatozoide del estrés oxidativo (Engelhardt y Breves, 2005).

2.6.2. Métodos de recuperación de espermatozoides epididimarios caninos

La primera dificultad en la utilización de los espermatozoides epididimarios es la obtención de los mismos. Muchos métodos de recuperación son descritos los cuales varían dependiendo del tamaño del órgano. En el caso de pequeños animales, el método de preferencia (fluctuación) consiste en cortar la cola del epidídimo y dejar reposar en un medio de recolección, de esta manera, los espermatozoides migrarán hacia el medio y serán recuperados (Axner y Linde-Fosberg, 1998; Axner *et al.*, 1999; Axner, 2000); una técnica similar consiste en hacer numerosos cortes en la cola del epidídimo, presionando suavemente y coger los espermatozoides por extravasamiento (Kaabi *et al.*, 2003). Kishikawa *et al.* (1999), utilizaron pinzas para comprimir la cola del epidídimo de ratas y recuperar los espermatozoides. Otros métodos son realizados utilizando una aguja para perforar los túbulos (Bartels *et al.*, 2000), o promoviendo un flujo retrógrado en la cola del epidídimo aplicando presión en los vasos deferentes hasta que el contenido salga a través de un corte realizado en la unión con el cuerpo del epidídimo (Garde *et al.*, 1994); la presión puede ser generada con una jeringa, que inyecta aire o algún líquido no perjudicial para los espermatozoides como algún tipo de dilutor (Lambrechts *et al.*, 1999; Comizzoli *et al.*, 2001). Martínez-Pastor *et al.* (2006) demostraron que la colección de espermatozoides de la cola del epidídimo a través del flujo retrogrado es la técnica más indicada, pues las muestras obtenidas son menos contaminadas y de mejor calidad seminal en relación a los otros métodos; sin embargo, posee la limitación de ser generalmente usada para grandes animales debido al tamaño del epidídimo y ser más compleja que las otras técnicas.

2.6.3. Medios utilizados para la recuperación de espermatozoides epididimarios caninos

Existen diversos medios utilizados para la recuperación de espermatozoides epididimarios caninos y los cuales han demostrado ser eficientes. Entre los más importantes se encuentran: solución salina fisiológica (Hewitt *et al.*, 2001), medio de capacitación canina (Yu y Leibo, 2002; Kawakami *et al.*, 1993; Mahi y Yanagimachi, 1978), fluido prostático (Hori *et al.*, 2005a), el cual fue previamente recolectado de otros caninos, centrifugado y almacenando el sobrenadante a -40°C , y solución Tris-fructosa citrato (Ponglowhapan *et al.*, 2006; Tittarelli *et al.*, 2006). Aunque poco utilizadas, también se han recuperado espermatozoides epididimarios utilizando solución de Ringer sin lactato (Martins *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2004, Villaverde *et al.*, 2006), y solución de Hartmann (Solución Ringer y lactato de sodio) (Hernández *et al.*, 2004).

2.6.4. Espermatozoides epididimarios caninos

El método de evaluación de espermatozoides epididimarios es el mismo que se realiza para eyaculados de semen canino (Tittarelli *et al.*, 2007).

Los porcentajes de motilidad en espermatozoides epididimarios encontrados por Hernández *et al.* (2004) y que fueron recuperados con solución de Hartmann fueron de $53.97 \pm 27.22\%$. Más adelante, Hori *et al.* (2005a) compararon la calidad de espermatozoides epididimarios recuperados con fluido prostático y eyaculados antes de la orquiectomía; estos autores, encontraron una motilidad espermática promedio de 88.6% ($n=9$) frente al 92.1% encontrada en los eyaculados, no encontrando diferencia estadística significativa entre los grupos. Posteriormente, Ponglowhapan *et al.* (2006) encontraron que el porcentaje promedio de espermatozoides epididimarios móviles de muestras frescas recolectados con dilutor Tris fue de 77.2 ± 6.8 ($n = 16$).

Con respecto a la concentración de espermatozoides epididimarios, Antypas *et al.* (1994) reportaron una concentración promedio de $340.5 \pm 38.5 \times 10^6$, más adelante, Hernández *et al.* (2004) encontraron una concentración de espermatozoides en la cola de los epidídimos de perros de 583.09×10^6 , similar a los valores encontrados por Hewitt (2001). Posteriormente en un estudio más exhaustivo, Hori *et al.* (2005a) estudiaron las concentraciones de espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo y eyaculados del mismo perro; encontrando cantidades de espermatozoides del

epidídimo izquierdo y derecho de 1.8 a 9.0×10^8 y 1.6 a 9.4×10^8 , respectivamente, con un promedio de $4.4 \pm 0.6 \times 10^8$ y $5.2 \pm 0.7 \times 10^8$, respectivamente; no habiendo diferencia entre los epidídimos izquierdo y derecho en los animales individuales; a su vez, encontraron una concentración de espermatozoides en el eyaculado de 2.7 hasta 11.1×10^8 , con un promedio de $6.2 \pm 0.7 \times 10^8$. La proporción de espermatozoides eyaculados del número total de espermatozoides epididimarios derecho e izquierdo fue desde 21.7% hasta 171.9% , con un promedio de $76.8 \pm 12.3\%$.

Los valores de morfología normal encontrada en la cola del epidídimo por Hernández *et al.* (2004) fueron de $68.84 \pm 13.07\%$, obteniendo espermatozoides con gotas citoplasmáticas en menor porcentaje en la cola del epidídimo (14.53%), que en el cuerpo y cabeza (20.25% y 31.15% , respectivamente), concluyendo, que hay un mayor número de espermatozoides maduros en la cola del epidídimo, lo que corrobora las funciones de la última porción del epidídimo: concentración, maduración y almacenamiento de los espermatozoides (Garner y Hafez, 2002). En otro estudio, Hori *et al.* (2005a) encontraron niveles promedio de anomalías espermáticas de 5.6% y 4.9% en los grupos de espermatozoides epididimarios y de eyaculado, respectivamente, no habiendo diferencia estadística significativa entre los dos grupos; las incidencias promedio de espermatozoides inmaduros fueron de 4.7% y 3.4% en los grupos de espermatozoides epididimarios y de eyaculado, respectivamente, no habiendo diferencia estadística significativa entre los dos grupos.

La evaluación de la integridad funcional de membrana, al igual que para la evaluación de eyaculados de semen fresco es, generalmente, evaluada mediante el uso del test hiposmótico (HOST) (Hishinuma y Sekine, 2003; Tittarelli *et al.*, 2006). Hishinuma y Sekine (2003), encontraron un porcentaje de $75.1 \pm 11.0\%$ de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo reactivos al test hiposmótico (HOST).

2.6.5. Congelamiento de espermatozoides epididimarios

Cuando se intenta congelar y descongelar espermatozoides epididimarios, es importante considerar las diferencias entre estos y los espermatozoides del eyaculado. Como anteriormente se mencionó, el epidídimo es dividido anatómicamente en cabeza, cuerpo y cola, aunque es un tubo continuo; dentro del epidídimo ocurre la maduración morfológica y la maduración funcional del espermatozoide. Los cambios morfológicos durante el tránsito por el epidídimo incluyen alteraciones en la forma de la cabeza debido a una reducción en el tamaño del acrosoma, y la pérdida de las

gotas citoplasmáticas adheridas a la pieza media (Hewitt, 1998). Las diferencias físicas en la forma y tamaño de los espermatozoides pueden influenciar en su susceptibilidad al daño osmótico durante el proceso de congelamiento-descongelamiento (Watson, 2000). El desarrollo funcional que ocurre durante el tránsito por el epidídimo, involucra cambios en la membrana durante los cuales el espermatozoide gana la habilidad para fecundar (Hewitt, 1998). Asimismo, las diferencias morfológicas y funcionales entre el espermatozoide epididimario y el eyaculado pueden influenciar la estabilidad de la membrana incluyendo la susceptibilidad al choque (shock) de frío y la resistencia a la tensión osmótica, así que los métodos utilizados para la criopreservación de eyaculado canino podrían no ser adecuados para el espermatozoide epididimario. Aunque las diferencias morfológicas y funcionales existen, es probable que el espermatozoide epididimario aún requiera la presencia de componentes similares dentro del dilutor de congelamiento (Hewitt *et al.*, 2001).

Existen varios factores esenciales que tienen que ser considerados cuando se establece un procedimiento de criopreservación (Watson, 1979). La composición del dilutor es importante, incluyendo la necesidad de agentes crioprotectores para proteger las membranas celulares del choque de frío (por ejemplo glicerol y yema de huevo), pero en concentraciones suficientemente bajas para prevenir el choque tóxico (Neville *et al.*, 1970). También, es importante la adición de otros agentes que previenen el choque osmótico incluyendo fuentes de energía (por ejemplo azúcares). Es importante el uso de un adecuado procedimiento de dilución y la inclusión de un período de enfriamiento durante el cual los espermatozoides son preparados para el congelamiento, como es un apropiado método de congelamiento y un método satisfactorio de descongelamiento el cual permita la óptima recuperación post-descongelamiento y la longevidad de las muestras (Watson, 1979).

Por lo anteriormente mencionado, pocos trabajos han sido ejecutados para desarrollar técnicas para el congelamiento de espermatozoides epididimarios teniendo limitado éxito en algunas especies (gato: Goodrowe y Hay, 1993; Hay y Goodrowe, 1993; cerdo: Nagai *et al.*, 1988; bovino: Watson, 1978). En caninos, Hewitt *et al.* (2001) en un estudio sobre criopreservación de espermatozoides epididimarios caninos recuperados y congelados inmediatamente después de la orquiectomía, demostraron que el proceso de criopreservación puede ser ejecutada utilizando métodos similares a aquellos establecidos para los eyaculados de la misma especie y utilizando como dilutor la solución a base de Tris-acido cítrico-fructosa y adicionando yema de huevo y glicerol; sin embargo, en este estudio no fue investigado el efecto del

tiempo transcurrido entre la escisión del epidídimo y la recuperación de espermatozoides sobre la calidad espermática. Posteriormente, Hori *et al.* (2005ab) evaluaron espermatozoides epididimarios que fueron escindidos y almacenados a 4°C por 0, 24 y 48 horas y congelados utilizando como dilutor la solución de yema de huevo, Tris-citrato-fructosa y como crioprotector glicerol; sin embargo, no se obtuvieron datos sobre calidad espermática a las 72 horas post orquiectomía.

Es así, que se concluye que no sólo es importante establecer un adecuado protocolo para la criopreservación de espermatozoides epididimarios caninos; sino también, conocer el tiempo límite que se tiene para recuperarlos de testículos refrigerados y que retengan su capacidad funcional después del congelamiento y descongelamiento en el mismo nivel que espermatozoides epididimarios congelados inmediatamente después de la orquiectomía.

Por lo tanto el objetivo del presente estudio fue determinar el tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo de caninos después de la muerte u orquiectomía del animal.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio y Animales

El estudio se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM), entre los meses de Junio 2008 a Marzo 2009. Los testículos fueron obtenidos de 20 caninos adultos (razas y mestizos), aparentemente saludables con edades entre 1 y 8 años, que fueron sometidos a orquiectomía. Las muestras procedieron de animales que formaron parte del curso de Cirugía Veterinaria y Patología Veterinaria de la FMV-UNMSM, así como de campañas de esterilizaciones realizadas en los distritos de La Molina, San Juan de Lurigancho y El Callao.

3.2. Recolección de muestras

Los testículos/epidídimos escindidos fueron ligados en el cordón espermático e inmediatamente colocados en vasos precipitados (un par por cada vaso) conteniendo solución salina fisiológica (NaCl al 0.9%, pH: 5.4 ± 0.2) a temperatura ambiente para evitar la desecación. Las muestras fueron transportadas desde el sitio de recolección hasta el laboratorio en un plazo máximo de 2 horas.

3.3. Metodología

Se evaluó el efecto del tiempo de almacenamiento de espermatozoides post orquiectomía sobre la calidad espermática antes y después de la criopreservación, formando los siguientes grupos:

Cuadro 1. Modelo de distribución de muestras obtenidas para el estudio

Grupo	n	Tiempo de almacenamiento
0	10 testículos/epidídimos	0 horas post – orquiectomía
24	10 testículos/epidídimos	24 horas post – orquiectomía
48	10 testículos/epidídimos	48 horas post – orquiectomía
72	10 testículos/epidídimos	72 horas post – orquiectomía

Cada testículo/epidídimo fue distribuido de forma aleatoria entre los cuatro grupos; de tal manera que ningún testículo, del mismo par, fue distribuido a un mismo grupo. Las muestras de los grupos 24, 48 y 72 fueron mantenidos en refrigeración (5°C) desde la llegada al laboratorio hasta su procesamiento.

3.3.1. Recuperación de espermatozoides epididimarios

El testículo/epidídimo fresco o refrigerado, fue colocado en una placa Petri, donde se realizó un lavado externo de la cola del epidídimo con solución salina fisiológica (NaCl al 0.9%) para remoción de la sangre y contaminantes externos. El tejido conjuntivo que recubre la cola fue removido por disección cuidadosa evitándose el rompimiento de los vasos sanguíneos y el ducto epididimario. La cola del epidídimo fue disecada del testículo y colocada en un vaso de precipitado de 100 ml conteniendo 4 ml de dilutor base Tris pre-calentado (35°C) (pH: 6.78) (Apéndice 1), el cual fue previamente preparado y almacenado en tubos Falcón de 15 ml, a 0°C hasta su utilización. Los espermatozoides fueron recuperados por el método de picado en trozos con una tijera quirúrgica (Jones, 1978; Kaabi *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2005ab) y mantenidos por 3 minutos a 35°C, permitiendo de esta manera que los espermatozoides nadan hacia el dilutor. Posteriormente, cada suspensión de espermatozoides fue aislada de los restos y transferida hacia un tubo Falcón de 15 ml estéril pre-calentado (35°C).

3.3.2. Evaluación de espermatozoides epididimarios antes del proceso de criopreservación

A. Motilidad

Los porcentajes de motilidad total y motilidad progresiva se evalúan subjetivamente colocando 20µl de cada muestra en una lámina portaobjetos precalentada (35°C) y se cubrió con un cubreobjetos, observándose posteriormente a 400x.

B. Integridad funcional de membrana

Para la evaluación de la integridad funcional de la membrana espermática se utilizó el Test hiposmótico descrito por Jeyendran *et al.* (1984) (Apéndice 2). El procedimiento consistió en incubar 50 µl de la muestra de espermatozoides en 500µl de la solución hiposmótica durante 1 hora a 37°C. Posteriormente una gota de la suspensión resultante fue extendida en un portaobjetos. Para facilitar la lectura de la lámina se tiñó con tinción Wright. Se evaluaron 200 espermatozoides por lámina utilizando el objetivo de 400x. Se consideraron espermatozoides con membrana funcional (HOST +) los que reaccionaron al estrés hiposmótico mediante la hinchazón de la parte distal de la cola espermática o enrollamiento de la misma, mientras que aquellos espermatozoides sin cambios en la cola se consideraron funcionalmente dañados (HOST-) (Fig. 4). Los resultados fueron expresados en % de espermatozoides con membrana funcional (HOST+).

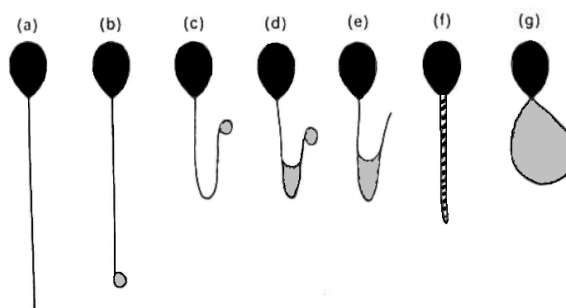


Figura 4. Representación esquemática de la apariencia morfológica de un espermatozoide no reaccionante (a) y reaccionante (b, c, d, e, f, g) al Test hiposmótico

Adicionalmente se evaluó morfología y concentración espermática como datos complementarios.

C. Morfología espermática

Para la evaluación de la morfología espermática se tiñó el extendido de espermatozoides con Tinción Wright. Luego, se evaluaron 200 espermatozoides por lámina a un aumento de 1000x. Se evaluaron los espermatozoides individuales en cuanto a anomalías que ocurren en la cabeza, pieza intermedia y cola (Fig.5). Los resultados fueron expresados en % de espermatozoides normales.

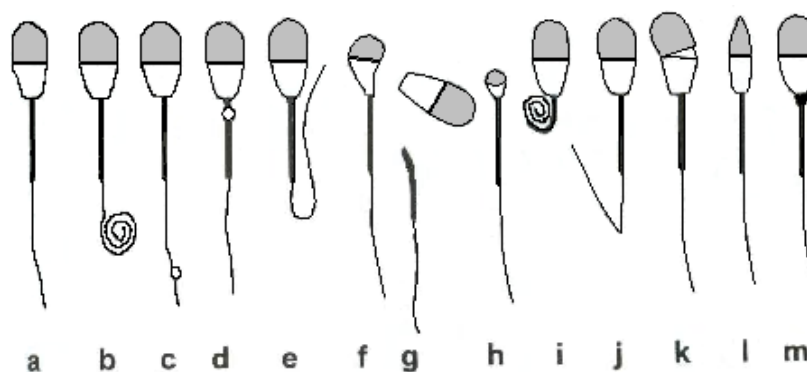


Figura 5. Frecuentes anomalías morfológicas en espermatozoides caninos: a) espermatozoide normal; b) Cola enrollada próxima; c) gota citoplasmática distal; d) gota citoplasmática proximal; e) cola doblada; f) cabeza anormal pequeña; g) cabeza ó cola suelta; h) cabeza normal pequeña; i) cola enrollada; j) cola quebrada; k) membrana acrosomal perdida; l) contorno cefálico anormal; m) cuello ancho (Johnston *et al.*, 2001).

D. Concentración espermática

La concentración se determinó a través del conteo de los espermatozoides en la Cámara de Neubauer. Se colocó en un tubo de ensayo de vidrio de 5ml, una dilución (muestra/agua destilada) de 1:50 (utilizada para el conteo de espermatozoides en semen canino) homogeneizándose por 5 segundos en forma manual. En la cámara de Neubauer se localizaron los 9 cuadrantes primarios y se cubrió con un cubreobjetos. Se colocó aproximadamente 10µl de la dilución en la cámara, hasta que

toda la zona se haya llenado, sin sobrepasarse. Se llevó la cámara al microscopio utilizando el objetivo de 400x, se localizó la zona de conteo (cuadrante principal central que contiene 25 cuadrantes secundarios) y se contaron 5 cuadrantes secundarios (4 esquinas y 1 central). El resultado se expresó en millones de espermatozoides/ml (Ax et al., 2002).

3.3.3. Criopreservación de espermatozoides epididimarios

Para la congelación, 2 ml de muestra diluida (Tris + espermatozoides epididimarios) fue colocada en un tubo Falcón de 15ml pre-calentado (35°C). Posteriormente se le añadió 20% de yema de huevo (v/v). De esta nueva suspensión se colocó, lentamente y por las paredes del tubo, 5% de glicerol (v/v). La muestra de espermatozoides preparados para congelación fue sometida a una curva de enfriamiento, desde los 35 hasta los 5°C; colocando el tubo falcón, que contiene la muestra, en un vaso de precipitando de 500 ml conteniendo 250 ml de agua natural pre calentada (35°C), esta se llevó a refrigeración para que se lleve a cabo lentamente la bajada de temperatura, desde los 35°C hasta los 5°C, con una duración aproximada, de este procedimiento, de 90 minutos. Se monitoreo que bajo este sistema el descenso de la temperatura es de 1° cada 3 minutos. Luego, se procedió a envasar en pajillas de 0.5ml. Las pajillas, fueron colocadas en gradillas, las cuales fueron guardadas en una canastilla (previamente enfriada 5°C). La canastilla se colocó en el cuello del tanque para ser expuesta a vapores de nitrógeno durante 20 minutos hasta alcanzar la T° de -25°C antes de ser sumergida directamente en el nitrógeno líquido.

3.3.4. Evaluación de espermatozoides epididimarios después del proceso de criopreservación

Para la evaluación de espermatozoides después de la criopreservación, cada pajilla fue sumergida en agua a 40°C por 40 segundos, y posteriormente, colocada en un microvial pre-calentado (35°C) e inmediatamente evaluada. La evaluación de la muestra descongelada consistió en evaluar la motilidad total, motilidad progresiva e integridad funcional de membrana.

3.4. Análisis estadístico

Para el análisis de datos, se empleó el programa estadístico Prism ® versión 3,0. Para determinar si existió diferencia estadística entre la motilidad espermática, integridad funcional de membrana, concentración y morfología espermática (variable dependiente) en el tiempo (0, 24, 48 y 72 horas) (variable independiente), se empleó el análisis de varianza (ANOVA). Si se encontraron diferencias estadísticas significativas se realizó el post-test de Tukey para determinar entre que grupos existió tal diferencia. Previamente, los datos fueron transformados a valores angulares ($\text{ángulo} = \arccos(\sqrt{x})$) para llevarlos a la distribución normal (Zar, 1999).

IV. RESULTADOS

Los resultados obtenidos de la evaluación realizada antes de la criopreservación de espermatozoides epididimarios almacenados a 5°C por 0, 24, 48 y 72 horas post-orquiectomía son mostrados en el cuadro 2.

Cuadro 2. Efecto del tiempo (0, 24, 48 y 72 horas) entre la muerte u orquiectomía de caninos hasta la recuperación de espermatozoides del epidídimo sobre la calidad espermática antes del proceso de criopreservación

Parámetros evaluados	Grupo (Tiempo de procesamiento)			
	0	24	48	72
Motilidad Total (%)	79.5±4.97 ^a	69.0±8.43 ^b	66.5±7.09 ^b	52.0±13.17 ^c
Motilidad Progresiva (%)	55.5±19.07 ^a	42.0±17.51 ^{ab}	45.0±11.55 ^{ab}	30.0±11.55 ^b
Integridad funcional de membrana (%)	76.43±4.05 ^a	64.13±13.51 ^a	69.42±12.11 ^a	68.92±10.35 ^a

(a, b, c) Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la misma fila.

Valores son promedio \pm desviación estándar.

Los resultados obtenidos de la evaluación realizada después de la criopreservación de espermatozoides epididimarios almacenados a 5°C por 0, 24, 48 y 72 horas post-orquiectomía son mostrados en el cuadro 3.

Cuadro 3. Efecto del tiempo (0, 24, 48 y 72 horas) entre la muerte u orquiectomía de caninos hasta la recuperación de espermatozoides del epidídimo sobre la calidad espermática después del proceso de criopreservación

Parámetros evaluados	Grupo (Tiempo de almacenamiento)			
	0	24	48	72
Motilidad Total (%)	17.00 ± 7.64 ^a	13.70 ± 3.97 ^a	11.40 ± 6.10 ^a	5.20 ± 4.21 ^b
Motilidad Progresiva (%)	7.20 ± 5.25 ^a	6.10 ± 3.00 ^a	3.70 ± 3.06 ^{ab}	1.80 ± 1.55 ^b
Integridad funcional de membrana (%)	50.46 ± 16.58 ^a	48.67 ± 12.74 ^a	48.90 ± 25.03 ^a	47.02 ± 15.16 ^a

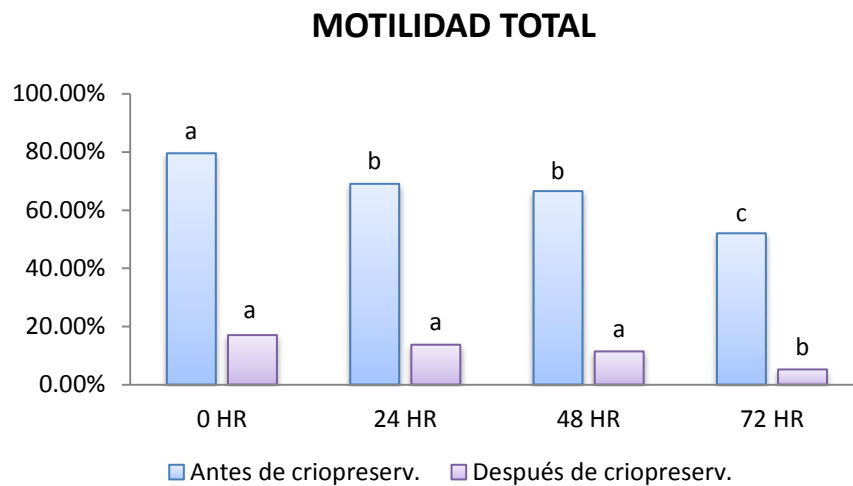
(a, b, c) Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la misma fila.

Valores son promedio ± desviación estándar.

En dichos cuadros se puede observar que para todos los parámetros evaluados antes y después de la criopreservación los valores varían, siendo estos cada vez menores conforme es mayor el tiempo de almacenamiento. Y, de todos estos parámetros, sólo la motilidad espermática presenta diferencias significativas ($p < 0.05$).

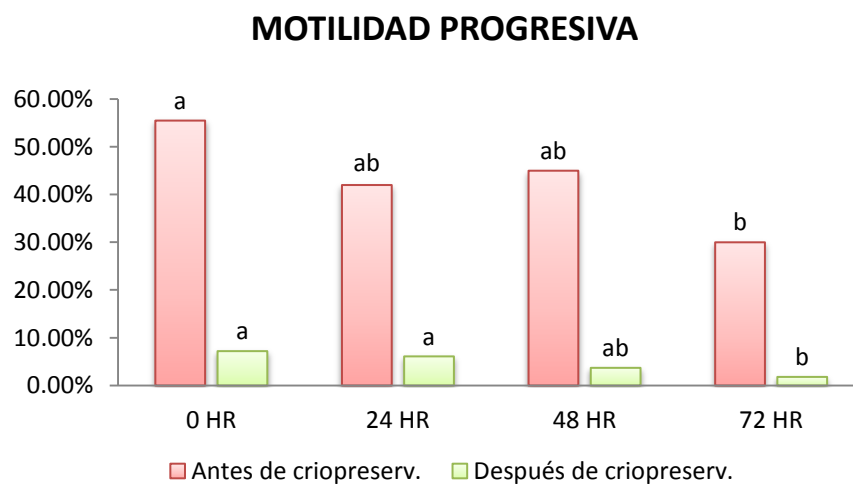
En relación a la motilidad total evaluada antes de la criopreservación (Fig. 6), se puede observar que en el grupo que se recuperan espermatozoides inmediatamente (grupo 0 horas) se observan aproximadamente 80% de espermatozoides móviles, variando significativamente en un 30% después de 72 horas de almacenamiento a 5°C ($p < 0.05$). Una similar tendencia se presenta entre las mismas horas para la motilidad progresiva (Fig. 7), observándose un 55% en el grupo de las 0 horas y sólo un 30% en el grupo de las 72 horas ($p < 0.05$). Para los valores obtenidos después de la criopreservación, la motilidad total en el grupo de las 0 horas es de aproximadamente 20%, en comparación con un 6% en el grupo de las 72 horas ($p < 0.05$); y para la motilidad progresiva la variación entre estos dos grupos a las mismas horas es de aproximadamente 7% ($p < 0.05$).

Figura 6. Curva de tendencia en el tiempo para el parámetro de motilidad total evaluado antes y después de la criopreservación de espermatozoides epididimarios caninos



(a, b, c) Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre columnas del mismo color.

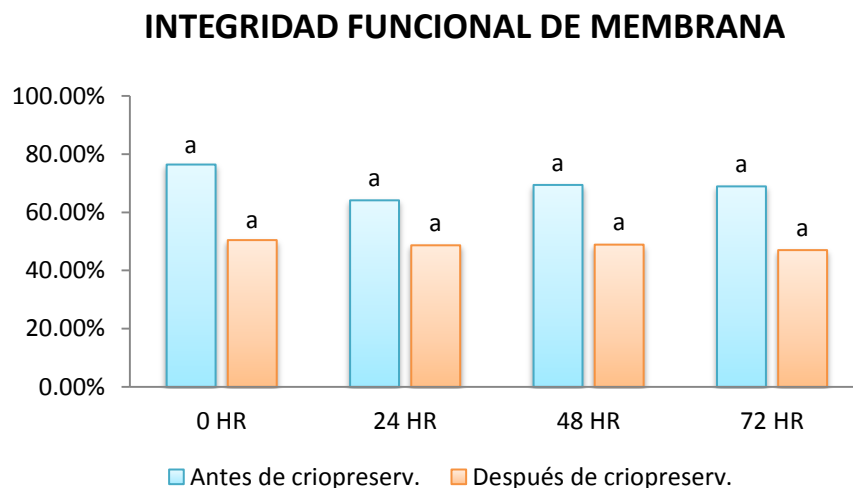
Figura 7. Curva de tendencia en el tiempo para el parámetro de motilidad progresiva evaluado antes y después de la criopreservación de espermatozoides epididimarios caninos



(a, b, c) Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre columnas del mismo color.

Con respecto a los valores de integridad funcional de membrana evaluada antes y después de la criopreservación (Fig. 8), se puede observar que no sufrieron cambios significativos a medida que aumentaba el tiempo de almacenamiento. Obteniéndose antes de la criopreservación una leve variación del 10% entre los grupos de 0 horas y 72 horas; y después de la criopreservación tan sólo una variación del 5% entre los mismos grupos.

Figura 8. Curva de tendencia en el tiempo para el parámetro de integridad funcional de membrana evaluado antes y después de la criopreservación de espermatozoides epididimarios caninos



(a, b, c) Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre columnas del mismo color.

Adicionalmente se obtuvieron datos sobre morfología y concentración espermática, siendo estas sólo evaluadas antes de la criopreservación; y las cuales son mostrados en el cuadro 4.

Cuadro 4. Efecto del tiempo (0, 24, 48 y 72 horas) entre la muerte u orquiectomía de caninos hasta la recuperación de espermatozoides del epidídimo sobre la morfología y concentración espermática antes del proceso de criopreservación

Parámetros evaluados	Grupo (Tiempo de procesamiento)			
	0	24	48	72
Morfología (% normales)	89.38±8.16 ^a	74.89±15.55 ^b	76.29±16.48 ^{ab}	64.14±14.89 ^b
Concentración (millones/ml)	80±53.33 ^a	71±59.86 ^a	54±50.35 ^a	66±73.45 ^a

(a, b, c) Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la misma fila.

Valores son promedio \pm desviación estándar.

Para los valores de morfología espermática se observó un mayor porcentaje de espermatozoide normales en el grupo de 0 horas (89.38%) en comparación con el grupo de 72 horas (64.14%) ($p < 0.05$). Sin embargo, la concentración espermática no fue afectada significativamente por el tiempo de almacenamiento; obteniéndose en el grupo de 0 horas una concentración de 80 millones de espermatozoides/ml y 67 millones de espermatozoides/ml en el grupo de 72 horas.

V. DISCUSIÓN

El presente estudio evalúa el efecto del tiempo (0, 24, 48 y 72 horas) que transcurre entre la orquiectomía o muerte del animal y la recuperación de espermatozoides epididimarios de caninos sobre diferentes parámetros de calidad espermática evaluados antes y después del proceso de criopreservación. Se sabe que es posible recuperar espermatozoides funcionales del epidídimo de perros de valor genético que han sufrido orquiectomía por motivos médicos o muerto súbitamente y que por estimación o por preservar el material genético del animal el dueño decida mantener sus genes por un largo periodo de tiempo hasta su utilización; sin embargo, como existen factores que imposibilitan que los epidídimos puedan ser procesados inmediatamente, es importante determinar el tiempo máximo en el cual se puedan recuperar y criopreservar espermatozoides epididimarios funcionales.

La tendencia general observada en los resultados obtenidos es que los distintos parámetros evaluados antes (motilidad, integridad funcional de membrana, morfología y concentración espermática) y después (motilidad e integridad funcional de membrana) de la criopreservación fueron disminuyendo conforme se incrementó el tiempo entre la orquiectomía o muerte y la recuperación de los espermatozoides del epidídimo de caninos, siendo esta disminución significativa para los parámetros de motilidad y morfología espermática.

En relación a la motilidad antes de la criopreservación se observó que es afectada significativamente por el tiempo; tal es así que entre los grupos de 0 y 24 horas ya se observaban diferencias significativas, tendencia que también se presentó entre los grupos de 48 y 72 horas. No obstante, la motilidad después de la criopreservación sólo fue afectada significativamente hasta después de 72 horas de la orquiectomía o muerte del animal. Los porcentajes de motilidad total antes de la criopreservación fueron superiores a los encontrados por Tittarelli *et al.* (2006) para los

tiempo de 24, 48 y 72 horas (32.9%, 17.0% y 13.5%, respectivamente) y por Ponglowhapan *et al.* (2006) para los tiempos de 0 y 48 horas (67.87% y 56.6%, respectivamente). Sin embargo, son ligeramente inferiores a los encontrados por Hori *et al.* (2005a) para los tiempos de 0, 24 y 48 horas (88.6%, 80.7% y 61.0%, respectivamente). De igual manera, los resultados de motilidad total encontrados después de la criopreservación son inferiores a los encontrados por Hori *et al.* (2005a), quienes obtuvieron porcentajes de motilidad para los tiempos de 0, 24 y 48 horas de 27.9%, 24.3% y 28.3%, respectivamente e igualmente son inferiores a los encontrados por Ponglowhapan *et al.* (2006) quienes obtuvieron porcentajes de 35.3% y 35.6% para los tiempos de 0 y 48 horas, respectivamente. Los valores altos de motilidad encontrados antes y después de la criopreservación por Hori *et al.* (2005a) se pueden deber a la utilización de fluido prostático como medio para recuperar los espermatozoides del epidídimo; y el cual pudo haber influenciado en la motilidad espermática inicial y por lo tanto obtener mejores porcentajes al descongelado. Sin embargo, la importancia funcional del plasma seminal aún es controversial. Por un lado Parrilla *et al.* (2004) y Barrios *et al.* (2000), en cerdos y carneros respectivamente, refieren que el plasma seminal protegería a los espermatozoides durante el congelamiento; mientras que Way *et al.* (2000) y England y Allen (1992), en toros y caninos respectivamente, indican que la adición de plasma seminal afecta negativamente la calidad seminal durante la criopreservación. De igual manera, Rota *et al.* (1995) demostraron en caninos que el plasma seminal puede ser perjudicial para la motilidad espermática y fisiología bajo ciertas condiciones de almacenamiento, sugiriendo que una posible ventaja de usar espermatozoides recuperados directamente del epidídimo puede ser el hecho de que ellos no han sido expuestos a este. Recientemente Hori *et al.*, (2009) obtuvieron mayores porcentajes de motilidad y viabilidad al descongelado en los espermatozoides epididimarios caninos recuperados con fluido prostático (FP) que con Tris-fructosa-citrato y yema de huevo (EYT-FC), lo que sugiere que los espermatozoides epididimarios sensibilizados en PF son resistentes a la criopreservación. Sin embargo, estos mismos autores concluyeron que es necesario realizar más estudios para comparar espermatozoides del eyaculado y del epidídimo de animales individuales ya que estos resultados fueron obtenidos de diferentes individuos y los efectos de la congelación pueden haber sido diferentes para cada individuo. Estos estudios muestran resultados variables con respecto a este tema lo que hace que aún no se tenga totalmente claro si hay o no influencia del plasma seminal en la obtención de una mejor calidad de espermatozoides epididimarios inmediatamente después de la recuperación y por consiguiente al descongelado.

Los elevados porcentajes de motilidad total encontrados después de la criopreservación por Ponglowhapan *et al.* (2006) se pueden deber a que después del descongelamiento, el contenido de la pajilla fue vaciado en 1ml de solución Tris-fructosa citrato a 37°C, algo que no fue realizado en nuestro estudio. Tal adición pudo haber liberado a los espermatozoides epididimarios de algunas sustancias esenciales utilizados en la congelación de semen como el glicerol, y del cual algunos autores sugieren que ejerce efectos tóxicos en el espermatozoide (Curry, 2000; Holt, 2000b).

En todos estos estudios, al igual que en nuestro estudio, llegan a la conclusión de que el tiempo que transcurre entre la muerte u orquiectomía y la recuperación de los espermatozoides antes de la criopreservación afecta de una manera significativa la motilidad espermática; no obstante, la motilidad espermática después de la criopreservación no se ve afectada significativamente, sino sólo hasta después de 72 horas de almacenamiento. En ese sentido, Hori *et al.* (2005a) sugieren que este efecto es debido a que el espermatozoide epididimario vulnerable con sensibilidad al frío pierde actividad debido a la exposición a temperaturas bajas (4°C-5°C) antes del congelamiento, disminuyendo la motilidad espermática. Pero, el espermatozoide resistente a la sensibilización al frío puede haber sido móvil después del congelamiento, resultando en la ausencia de una diferencia significativa en la motilidad espermática al descongelamiento.

Como se ha descrito anteriormente, la motilidad espermática refleja la viabilidad de los espermatozoides y permite predecir la capacidad de los mismos para fecundar al ovocito (Feldman y Nelson, 2000). Se sabe, que existen diversos factores que producen una disminución de la motilidad en los espermatozoides; para nuestro estudio se consideró que existieron dos factores importantes que hicieron que la motilidad evaluada antes y después de la criopreservación se vea afectada. El principal factor que produce una disminución en la motilidad de los espermatozoides epididimarios antes de la criopreservación es el proceso de autólisis como consecuencia del daño celular causado por la hipoxia y anoxia que se produce por la detención del flujo de sangre hacia los tejidos del testículo y epidídimo después de la muerte del animal. Los espermatozoides en el epidídimo de los animales vivos se encuentran normalmente en un medio anaerobio, de pH bajo y no contiene hidratos de carbono como fuente de energía, por lo que la respiración y la glucólisis del espermatozoide en este medio se encuentran suprimidos, por lo que el microambiente epididimario hace que estos espermatozoides permanezcan inmóviles y viables aproximadamente un mes (Salisbury y Lodge, 1962). Sin embargo, ante la muerte u orquiectomía del animal, el testículo queda desprovisto del riego sanguíneo que se da

a través de las arterias y venas testiculares (Getty *et al.*, 1981); consecuentemente, ya no se produce el intercambio gaseoso y nutricio entre la sangre circulante y los tejidos de la gónada (testículo y epidídimo), resultando en el infarto de los mismos (Trigo y Mateos, 1993). Esta detención del flujo de sangre y la posterior autólisis post mortem del tejido, deteriora notablemente la calidad del espermatozoide. Como una razón para la disminución en la calidad del espermatozoide recuperado del epidídimo y utilizando la degeneración del tejido epididimal en ratones y ciervo sica (*Cervus nippon*), Songsasen *et al.* (1998) e Hishimuna *et al.* (2003), sugieren que ocurre desprendimiento y picnosis en las células epiteliales del conducto del epidídimo, respectivamente. De igual manera, Tittarelli *et al.* (2007) sugieren que la autólisis produce cambios en la permeabilidad selectiva de la membrana de las células del epidídimo. No obstante, en este estudio la descomposición del órgano fue retardada por la utilización adecuada de la temperatura y el medio de almacenamiento a la que fue colocado el testículo después de la orquiectomía o muerte del animal. El almacenamiento del testículo a 5°C permite obtener mejor calidad de los espermatozoides comparados con el almacenado de estos órganos a temperatura ambiente; esto se explica porque ocurre una disminución del metabolismo celular de los espermatozoides almacenados a 4°C o 5°C; en un estudio realizado por Stilley *et al.* (2000) comprobaron en caninos a temperatura ambiente (22°C) se produce autólisis completa de los tejidos a las 54 horas post-mortem y que la motilidad disminuye en los espermatozoides recuperados a las 24 horas, de igual manera observaron que cuando los epidídimos se almacenan refrigerados a 4°C o 5°C se obtienen células espermáticas vivas hasta el séptimo día. Un medio de almacenamiento como el cloruro de sodio al 0.9% (suero fisiológico) actúa en la prevención de la deshidratación del epidídimo mejorando la conservación del mismo y de esta manera conserva las características del medio interno del órgano lo cual resulta en una mejor conservación de los espermatozoides epididimarios (Sankai *et al.*, 2001).

Otro factor importante que produce una disminución de la motilidad después de la criopreservación es el mismo proceso de criopreservación, ya que es una técnica que puede conducir a la muerte o bien a alteraciones funcionales del espermatozoide. La reducción de la temperatura por debajo de los 5°C induce una serie de alteraciones de naturaleza biofísica en el espermatozoide, donde el mayor desafío para las células en el proceso de congelación no es resistir a las bajas temperaturas del nitrógeno líquido dado que a -196°C no se producen reacciones químicas, físicas ni biológicas; sino mantener la viabilidad durante los procesos de congelación y descongelación,

específicamente entre los -5 a -25°C, ya que varios autores han demostrado que estos son los rangos críticos de temperatura (Mazur, 1984; Vila, 1984; Amann y Pickett, 1987), y en la cual el espermatozoide puede sufrir la pérdida de viabilidad debido a alteraciones producto del choque térmico, produciendo cambios en la función y estructura celular del espermatozoide, y cuya señal inequívoca es la pérdida de motilidad total o movimientos circulares con pérdida precoz de la motilidad al momento del descongelamiento (Quinn y White, 1966).

Con respecto a los valores de integridad funcional de membrana antes y después de la criopreservación, se observó que disminuyen a medida que aumenta el tiempo entre la muerte/orquiectomía y la recuperación de los espermatozoides epididimarios; no encontrando diferencias significativas entre grupos. Los resultados de integridad funcional de membrana antes de la criopreservación son similares a los encontrados por Ponglowhapan *et al* (2006) en los tiempos de 0 y 48 horas (78.4% y 72.4%, respectivamente) y que al igual que en nuestro estudio no encontraron diferencias significativas. Sin embargo, son ligeramente inferiores a los encontrados por Tittarelli *et al* (2006), quienes encontraron porcentajes de 84.0%, 82.1% y 73.8% en los grupos de 24, 48 y 72 horas, encontrando diferencias después de 72 horas de almacenamiento. Los valores obtenidos después de la congelación son similares a los encontrados por Ponglowhapan *et al* (2006) en los tiempos de 0 y 48 horas (46.4% y 42.9%, respectivamente) y que al igual que en nuestro estudio no encontraron diferencias significativas.

Se sabe que el mantenimiento de la integridad funcional de la membrana plasmática es de fundamental importancia para que una célula espermática finalice su función primordial que es la fecundación; además para recibir señales que modifican a la célula a lo largo del proceso de espermatogénesis así como en el tránsito y almacenamiento en el epidídimo, y finalmente en la capacitación (Cunningham, 2003). En nuestro estudio la membrana plasmática, a pesar de no ser afectada tan drásticamente como la motilidad, también se vio afectada por los procesos de autólisis y congelación. Los fenómenos autolíticos se ven favorecidos por las altas temperaturas, definiendo muerte de los espermatozoides y/o daño de las membranas u organelas de los mismos con la consecuente disminución de la viabilidad de los gametos. Sin embargo, la colocación del testículo/epidídimo a una temperatura (5°C) y un medio de almacenado (cloruro de sodio al 0.9%) adecuado permitió preservar los tejidos epididimarios y enlenteció la muerte celular favoreciendo en forma indirecta la sobrevivencia dentro del epidídimo de los espermatozoides y de su membrana plasmática, y por lo tanto el mantenimiento de sus funciones. De igual manera, la membrana

celular es la estructura que sufre mayor daño en los procesos de congelación debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos, ya que la transición de lípidos fluidos a sólidos altera las funciones de la membrana y le da un alto grado de fragilidad. A su vez, durante la deshidratación celular que tiene lugar en el proceso de congelación se puede presentar una pérdida de lípidos lo cual afectaría la integridad de la membrana plasmática por pérdida de su capacidad de expansión durante la rehidratación durante el descongelamiento.

A pesar de presentarse como datos adicionales, la evaluación de la morfología y concentración espermática toma parte importante al momento de determinar hasta qué punto se pueden recuperar y congelar espermatozoides epididimarios funcionales. En nuestro estudio, la presencia de espermatozoides normales disminuyó a medida que aumentaba el tiempo transcurrido entre la orquiectomía o muerte y la recuperación de los espermatozoides, encontrándose variaciones significativas después de 24 horas. Valores similares fueron encontrados por Hori *et al.* (2005a) para la evaluación de espermatozoides epididimarios a las 0, 24 y 48 horas antes de la criopreservación. Hernández *et al.* (2004) realizaron un estudio donde caracterizaron espermatozoides procedentes de tres zonas del epidídimo de caninos y en la que obtuvieron porcentajes de normalidad inferiores a los encontrados a las 0 horas en nuestro estudio. Adicionalmente, los porcentajes de morfología normal encontrado en eyaculados de semen caninos (Feldman y Nelson, 2000) son ligeramente superiores a los encontrados en este estudio para el grupo de 0 horas.

Los cambios morfológicos que sufren los espermatozoides epididimarios, también son atribuidos al proceso de autólisis que sufre el epidídimo, incrementando de esta manera la incidencia de espermatozoides anormales a medida que aumentaba el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, este proceso no es el único que se debe de tomar en cuenta para poder explicar la presencia de espermatozoides anormales en las muestras obtenidas del epidídimo, ya que de una manera subjetiva se pudo determinar que una gran proporción de espermatozoides presentaban gota citoplasmática proximal, resquicio que se pierde durante la eyaculación, y el cual está relacionado con el proceso de maduración que sufre el espermatozoide durante su pasaje por el epidídimo (Feldman y Nelson, 2000).

Al igual que la morfología, la concentración espermática varió en los diferentes grupos de almacenamiento, aunque no se encontraron diferencias significativas. Nuestros resultados son inferiores a los encontrados por Hewitt *et al.* (2001), quienes encontraron en promedio 100.8 millones de espermatozoides/ml a las 0 horas: aunque no se tiene muy claro si esta cantidad pertenece a uno o ambos testículos, estos

resultados pueden estar influenciados por la edad del animal, ya que evaluaron caninos de 0.5 a 6 años. A pesar que la concentración de espermatozoides epididimarios a las 0 horas en nuestro estudio es aparentemente baja comparado con eyaculados de semen canino, se hace necesario considerar que los promedios encontrados sólo pertenecen a la evaluación de sólo un testículo en comparación con las muestras de semen en la cual participan los dos órganos.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que es posible obtener espermatozoides epididimarios funcionales hasta las 48 horas de la orquiectomía/muerte del canino y que pueden ser congelados, ya que después de ese tiempo todos los parámetros obtenidos se ven afectados significativamente por el tiempo. Sin embargo, dado la baja calidad espermática encontrada después de la criopreservación, la posibilidad de utilizar espermatozoides epididimarios en inseminación artificial sólo puede ser tomado en cuenta si se tratase de un canino de gran valor genético y en la cual la muestra sólo puede ser utilizada para realizar inseminación artificial directamente en los cuernos uterinos o la utilización de los espermatozoides para fecundación *in vitro* teniéndose de esta forma más posibilidades de obtener crías.

VI. CONCLUSIONES

- Los parámetros (motilidad, integridad funcional de membrana, morfología y concentración espermática) evaluados hasta las 48 horas de la orquiectomía en caninos no variaron significativamente con respecto a los evaluados a las 0 horas de la orquiectomía, antes de la criopreservación.
- Los parámetros (motilidad e integridad funcional de membrana) evaluados hasta las 48 horas de la orquiectomía en caninos no variaron significativamente con respecto a los evaluados a las 0 horas de la orquiectomía, después de la criopreservación.
- Los parámetros evaluados después de la criopreservación se encontraron drásticamente reducidos en comparación con los parámetros evaluados antes de la criopreservación por efecto del congelamiento.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agüera CS. 1995. Aparato genital masculino. En: García SA, Castejon MF, eds. Fisiología veterinaria. 1ª ed. España: MacGraw-Hill. p 827-839.
- Aguiar PHP, Costa MELT, Abreu JJ, Abreu CP. 1994. Coleta e avaliação de sêmen canino. Arq Bras Med Vet Zootec 46: 537-544.
- Aiello SE. 2000. El manual de Merck de veterinaria. 5ª ed. Barcelona: Océano. 2558 p.
- Álamo D, Batista M, González F, Rodríguez N, Cruz G, Cabrera F, Gracia A. 2005. Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of -152 degrees C as a viable alternative to liquid nitrogen. Theriogenology 63: 72-82.
- Alhaider AK, Watson PF. 2008. Cryopreservation of dog semen: The effects of Equex STM paste on plasma membrane fluidity and the control of intracellular free calcium. Anim Reprod Sci 110: 147-161.
- Alves SGG, Snoeck PPN, Ribeiro Filho A de L, Bittencourt RF, Portela APM, Melo MIV, Henry M. 2004. Effects of solution, incubation time and sperm fixation on equine cryopreserved sperm cells submitted to the hypoosmotic swelling test. XV International Congress on Animal Reproduction 2: 508-508.
- Amann RP, Graham JK. 1993. Spermatozoal function. En: McKinnon AO, Voss J, eds. Equine reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger. p 715-745.

- Amann RP, Griel LC. 1976. Fertility of bovine spermatozoa from rete testis, cauda epididymidis and ejaculated semen. *J Dairy Science* 57 (2): 212-219.
- Amann RP, Pickett BW. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7: 145-176.
- Andersen K. 1975. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchtygiene* 10: 1-4.
- Antypas S, Sofikitis N, Rodriguez F, Zavos PM, Miyagawa I. 1994. Bilateral effect of unilateral vasectomy on testicular testosterone biosynthesis. *J Pediatric surgery* 29: 828-831.
- Ax RL, Dally M, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME. 2002. Evaluación del semen. En: Háfiez ESE, Háfiez B, eds. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7ª ed. México: MacGraw-Hill. p 375-386.
- Axné E, Linde-Fosberg C, Einarsson S. 1999. Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat. *Theriogenology* 52: 767-778.
- Axné E, Linde-Fosberg C. 1998. Mating and artificial insemination. En: Simpson G, England GC, Harvey M, eds. *Small animal reproduction and neonatology*. Cheltenham: BSAVA. p 105-111.
- Axner E. 2000. Sperm morphology and maturation in the domestic cat (*Felis Silvestris Catus*), with special reference to the morphology and function of the epididymis. *Acta Univ Agric Suec* 60: 9-39.
- Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod* 63: 1531-1537.
- Bartels P, Lubbe K, Kilian I, Friedmann Y, Mortimer D. 2000. Vitro maturation and fertilization of lion (*Panthera leo*) oocytes using frozen-thawed epididymal

spermatozoa recovered by cauda epididymectomy of an immobilized lion. *Theriogenology* 53: 325.

- Bateman H. 2001. Effects of semen extender composition and cooling methods on canine sperm function and cryo-survival. Tesis para optar el grado de Magíster en Ciencias. Ottawa: Universidad de Guelph. 102 p.
- Batista M, Alamo D, Gonzalez F, Cruz MG, Gracia A. 2006. Influence of the freezing technique (nitrogen liquid vs ultrafreezer of -152 degrees C) and male-to-male variation over the semen quality in Canarian Mastiff breed dogs. *Reprod Dom Anim* 41: 423-428.
- Blash S, Melican D, Gavin W. 2000. Criopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology* 54: 899-905.
- Bouchard GF, Morris JK, Sikes JD, Youngquist RS. 1990. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. *Theriogenology* 34: 147-157.
- Bruemmer JE, Reger H, Zibinski G, Squires EL. 2002. Effects of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 58: 405-407.
- Cardoso RCS, Silva AR, Uchoa DC, Silva LDM. 2003. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology* 59: 743-751.
- Carlotto G. Efecto del momento de adición del glicerol durante la curva de enfriamiento sobre la calidad espermática durante el proceso de criopreservación de semen canino. Tesis de Médico veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 54 p.
- Chirinéa VH, Martins MIM, Souza FF, Tebet JM, Papa FO, Lopes MD. 2006. Características morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios diluentes. *Ci Anim Bras* 7: 407-415.

- Christiansen YJ. 1988. Reprodução no cão e no gato. São Paulo: Manole. 362 p.
- Colas G. 1975. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep frozen ram semen. J Reprod Fertil 42: 277-285.
- Comizzoli P, Mermillod P, Cognie Y, Chai N, Legendre X, Mauge R. 2001. Succesful in vitro production of embryos in the red deer (*Cervus elaphus*) and the sika deer (*Cervus nippon*). Theriogenology 55: 649-659.
- Concannon PW, Batista M. 1989. Canine semen freezing and artificial insemination. En: Kirk RW, ed. Current veterinary therapy. Philadelphia: WB Saunders. p 1247-1259.
- Cunha ICN. 2002. Criopreservação do sêmen de cães. Tesis de doctorado. Botucatu: Universidade Estadual Paulista. 149 p.
- Cunha ICN. 2008. Exame andrológico do cao. Jornal Brasileiro de Ciência Animal 1: 49-65.
- Cunningham JG. 2003. Fisiología veterinaria. 3ª ed. Madrid: Elsevier. 576 p.
- Curry MR. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. Rev Reprod 5: 46-52.
- Engelhardt WV, Breves G. 2005. Fisiología veterinaria. 1ª ed. España: Acribia. 704 p.
- England GC, Allen WE. 1992. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. I. Potencial influences during processing for artificial insemination. Theriogenology 37: 363-371.
- England GCW, Ponzio P. 1996. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. Theriogenology 46: 165-171.

- England GCW. 1993. Cryopreservation of dog semen: a review. J Reprod Fertil 47: 243 -255.
- Ewing LL, Chang TSK. 1986. Physiology of male reproduction. En: Walsh PC et al., ed. Campbell's urology. Philadelphia: WB Saunders. p 200-274.
- Fahy GM. 1986. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. Cryobiology 23: 1-13.
- Farstad W, Andersen-Berg K. 1989. Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. J Reprod Fertil 39: 289-292.
- Farstad W. 1996. Semen cryopreservation in dogs and foxes. Anim Reprod Sci 42: 251-260.
- Feldman EC, Nelson RW. 2000. Endocrinología y reproducción en perros y gatos. 2ª ed. México: McGraw-Hill. 866 p.
- Foote RH, Swierstra EE, Hunt WL. 1972. Spermatogenesis in the dog. Anat Rec 173: 341-351.
- Ford WCL. 2006. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round?. Human Reproduction Update 12 (Suppl. 3): 269-274.
- Foulkes JA. 1977. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. J Reprod Fertil 49: 277-284.
- Frandson RD, Spurgeon TL. 1995. Anatomía y fisiología de los animales domésticos. 5ª ed. México: Interamericana-McGraw-Hill. 560 p.
- Gao DY, Ashworth E, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Crister JK. 1993. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa. Biol Reprod 49: 112-123.
- Garde J, Aguado M, Perez S, Garrido D, Perez-Guzman M, Montoro V. 1994. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem ram. Theriogenology 41: 2003.

- 55

- Hernández PJE, Gutiérrez RY, Fernández RF, Gómez NNE. 2004. Obtención y caracterización de espermatozoides procedentes de tres zonas del epidídimo de caninos. *Rev Salud Anim* 26: 53-57.
- Hewitt DA, Leahy R, Sheldon IM, England GCW. 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Animal Reproduction Science* 67: 101-111.
- Hewitt DA. 1998. Physiology and endocrinology of the male. En: *Manual of Reproduction and Periparturient Care*. Cheltenham: BSAVA. p 61–69.
- Hishinuma M, Sekine J. 2003. Evaluation of membrane integrity of canine epididymal spermatozoa by short hypoosmotic swelling test with ultrapure water. *J Vet Med Sci* 65: 817-820.
- Hishinuma M, Suzuki K, Sekine J. 2003. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus Nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4°C. *Theriogenology* 59: 813-820.
- Holt WV. 2000a. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62: 3-22.
- Holt WV. 2000b. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53: 47-58.
- Hori T, Hagiuda K, Endo S, Hayama A, Kawakami E, Tsutsui T. 2005a. Unilateral intrauterine insemination with cryopreserved caudal epididymal sperm recovered from refrigerated canine epididymides. *J Vet Med Sci* 67: 1141-1147.
- Hori T, Hagiuda K, Hayama A, Kawakami E, Tsutsui T. 2005b. Unilateral intrauterine insemination with prostatic fluid-sensitized frozen caudal epididymal sperm in beagles dogs. *Theriogenology* 63: 1573-1583.
- Hori T, Uehara Y, Kawakami E, Tsutsui T. 2009. Influence of the time between removal and cooling of the canine epididymis on post-thaw caudal epididymal sperm quality. *J Vet Med Sci* 71: 811-815.

- Ikeda H, Kikuchi K, Noguchi J, Takeda H, Shimada A, Mizokami T, Kaneko H. 2002. Effect of preincubation of cryopreserved porcine epididymal sperm. *Theriogenology* 57: 1309-1318.
- Ivanova-Kicheva MG, Bobadov N, Somlev B. 1997. Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-ml aluminum tubes using three extenders. *Theriogenology* 48: 1343-1349.
- Ivanova-Kicheva MG, Subev MS, Bobadov DP, Rouseva IA. 1995. Effects of thawing regimens on the morphofunctional state of canine spermatozoa. *Theriogenology* 44: 563-569.
- Jasko DJ. 1994. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Ars Vet* 10: 156-165.
- Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal Reproduction Fertility* 70: 219-228.
- Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PNS. 2001. Canine and feline theriogenology. Philadelphia: W.B.Saunders. 592 p.
- Jone R. 1978. Comparative biochemistry of mammalian epididymal plasma. *Comp Biochem Biophys* 61B: 157-165.
- Johnston SD. 1991. Performing a complete canine semen evaluation in small animal hospital. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 21: 545-551.
- Kaabi M, Paz P, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, Rouissi H, Herraiez P, Anel L. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology* 60: 1249-1259.
- Kawakami E, Tsutsui T, Ogasa A. 1991. Histological observations of the reproductive organs of the male dog from birth to sexual maturity. *J Vet Med Sci* 53: 241-248.

- Kawakami E, Vande Voort CA, Mahi-Brown CA, Overstreet JW. 1993. Induction of acrosome reaction of canine sperm by homologous zona pellucida. *Biol Reprod* 48: 841-845.
- Kishikawa H, Tateno H, Yanagimachi R. 1999. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4°C. *Journal of Reproduction and Fertility* 116: 217-222.
- Kumi-Diaka J. 1993. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology* 39: 1279-1289.
- Lambrechts H, Niekerk F, Coetzer FW, Cloete S, Van Der HG. 1999. The effect of cryopreservation on the survivability, viability and motility of epididymal African buffalo (*Syncerus caffer*) spermatozoa. *Theriogenology* 52: 1241-1249.
- Linde-Forsberg C, Forsberg M. 1989. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J Reprod Fertil* 39: 299-310.
- Mahi CA, Yanagimachi R. 1978. Capacitation, acrosome reaction and egg penetration by canine spermatozoa in a simple defined media. *Gam Res* 1: 101-109.
- Mann T. 1964. *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract*. 2^a ed. London: Methuen. 240 p.
- Martínez-Pastor F, Macias VG, Álvarez M, Chamorro C, Herraiz P, Paz P, Anel L. 2006. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology* 65: 471-485.
- Martins MIM, Souza FF, Chirinéa VH, Lopes MD. 2004. Functional and structural analysis of canine spermatozoa obtained from the epididymis and submitted to cryopreservation. En: *International Symposium on Canine and Feline Reproduction*. São Paulo. p 222-224.

- Martins MIM, Souza FF, Chirinéa VH, Tebet J, Lopes MD. 2003. Viabilidade de espermatozóides criopreservados, obtidos do epidídimo de cães. En: Mostra Científica da FMVZ/UNESP. p 121.
- Martins MIM. 2005. Efeito da sazonalidade sobre a função testicular de cães. Tesis de doctorado em Reprodución Animal. Botucatu:Universidade Estadual Paulista. 123 p.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am J Physiol 247: 125-142.
- Mazur P, Leibo SP, Chu EHY. 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury. Exp Cell Res 71: 345-355.
- Melo MIV. 1999. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino. Tesis de doctorado en Veterinaria. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 67p.
- Mies Filho A. 1987. Reprodução dos animais e inseminação artificial. 6 ed. Porto Alegre: Sulina. 750 p.
- Morton DB, Bruce SG. 1989. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. J Reprod Fertil 39: 311-316.
- Nagai T, Takahashi T, Masuda H, Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S, Hanada A. 1988. In vitro fertilisation of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. J Reprod Fert 84: 585–591.
- Neville WJ, Macpherson JW, King GJ. 1970. The contraceptive action of glycerol in guilts. J Anim Sci 31: 227.
- Nunes JF, Ciríaco ALT, Suassuna U. 1997. Produção e reprodução de caprinos e ovinos. 2ª ed. Fortaleza: Gráfica LCR. 199 p.
- Oberst ER, Jobim MIM, Mattos RC, Kroth E, Lara G, Smiderie W, Bronzatto M. 2003. Teste hiposmótico e sua relação com outros métodos para avaliação da

integridade da membrana plasmática do carneiro. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 27 (Supl.3): 375-376.

- Oettlé EE, Soley JT. 1985. Infertility in a malttese poodle as a result of a sperm midpiece defect. *J S Afr Vet Assoc* 56: 103-106.
- Oettlé EE. 1993. Sperm morphology and fertility in the dog. *J Reprod Fertil* 47: 257-260.
- Oga F. 2008. Uso de glicerol, metil-formamida e dimetil-formamidacomo crioprotetores do sêmen canino. Tesis de maestria. Brasília: Universidade de Brasília. 73 p.
- Olar TT, Amann RP, Pickett BW. 1983. Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa, and extragonadal spermatozoal reserves of the dog. *Biol Reprod* 29: 1114-1120.
- Olar TT, Bowen RA, Pickett BW. 1989. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology* 31: 451-461.
- Parks EJ, Graham JK. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38: 209-222.
- Parrilla I, Vazquez JM, Cuello C, Gil MA, Roca J, Di Berardino D, Martinez EA. 2004. Hoechst 33342 stain and u.v. laser exposure do not induce genotoxic effects in flow-sorted boar spermatozoa. *Reproduction* 128: 615-621.
- Parrish JJ, First NL. 1993. Fertilization. En: King GJ, Neimann-Sorensen A, Tribe DE, eds. *World animal science—Reproduction in domesticated animals*. New York: Elsevier. p 195-227.
- Peña A, Linde-Forsberg C. 2000a. Effects of Equex, one or two step dilution and two freezing thawing rates on postthaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54: 859-875.

- Peña A, Linde-Forsberg C. 2000b. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54: 703-718.
- Peña AI, Barrio F, Quintela LA, Herradón PG. 1998. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology* 50: 163-174.
- Peña AI. 1997. Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelacion-descongelacion. Tesis doctoral. Lugo: Universidade de Santiago de Compostela.
- Peña AI. 2000. Flow cytometry in the assessment of fresh and frozen-thawed dog semen, and the effects of different cryopreservation methods on post-thaw sperm survival and longevity. Tese doctoral .Uppsala: Swedish University of Agriculture Sciences. 86 p.
- Peña FJ, Núñez-Martínez I, Morán JM. 2006. Semen Technologies in Dog Breeding: an Update. *Reproduction in Domestic Animals* 41 (Suppl. 2): 21–29.
- Pérez-Pé R, Cébrian-Pérez JÁ, Muiño-Blanco T. 2001. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology* 56: 425-434.
- Ponglowhapan S, Chatdarong K, Sirivaidyapong S, Lohachit C. 2006. Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. *Theriogenology* 66: 1633-1636.
- Purswell BJ, Lthouse GC, Root MV. 1992. Guidelines for using the canine breeding soundness evaluation form. En: Annual Meeting of the Society for *Theriogenology*. Montgomery. p 174-181.
- Quinn PJ, White IG. 1966. The effect of cold shock and deep-freezing on the concentration of major cations in spermatozoa. *J Reprod Fertil* 12: 263-270.

- Rigau T, Farré M, Ballester J, Mogas T, Peña A, Rodriguez-Gill JE. 2001. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology* 56: 801-815.
- Rodrigues BA. 1997. Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 176 p.
- Rodriguez-Martinez H, Ekwall H, Linde-Forsberg C. 1993. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *J. Reprod Fertil* 47: p 279-285.
- Rota A, Linde-Forsberg C, Vannozzi J. 1998. Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing rates. *Reproduction in Domestic Animals* 33: 355-361.
- Rota A, Milani C, Cabianca G, Martini M. 2006. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology* 65: 1848-1858.
- Rota A, Rota A, Martine M, Milani C, Romagnoli S. 2005. Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. *Reprod Nutr Dev* 45: 29-37.
- Rota A, Ström B, Linde-Forsberg C. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology* 44: 885-900.
- Rota A. 1998. Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa. Tesis doctoral. Uppsala Sweden: SLU Service/Reprod. 42 p.
- Salamon S, Maxwell WMC. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science* 37: 185 - 249.
- Salgueiro CCM, Nunes JF, Mateos-Rex E, Cordeiro MA, Magalhaes DM, Cavalcante JMM, Palácio ARS. 2003. Avaliação da qualidade do sêmen caprino

pós-descongelamento através do teste hiposmótico. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 27: 377-378.

- Salisbury GW, Lodge JR. 1962. Metabolism of spermatozoa. *Adv Enzyme Regul* 24: 35-104.
- Salisbury GW, Vandemark NL. 1978. *Physiology of reproduction and artificial insemination*. San Francisco: W H Freeman. 361 p.
- Sánchez A, Rubilar J, Gatica R. 2002. Uso de la prueba hiposmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado. *Arch med vet* 34: p 131-134.
- Sankai T, Tsuchiya H, Ogonuki N. 2001. Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 55: 1759-1768.
- Santos ADF, Torres CAA, Fonseca JF, Borges AM, Rovay H, Goretti RG, Guimaraes JD, Costa EP, Barbosa LP, Maffili VV, Fraga DBM. 2001. Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 25: 438-439.
- Schafer-Somi S, Kluger S, Knapp E, Klein D, Aurich C. 2006. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology* 66: 173-182.
- Seager SWJ, Fletcher WS. 1972. Progress on the use of frozen semen in the dog. *Vet Rec* 92: 6-10.
- Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM. 1998. Effect of the thawing on the viability of canine semen in vitro. *Ciência Animal* 8: 75-80.
- Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM. 2000. Congelação de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de Tris e água de coco. *Ci Rur* 6: 1021-1025.

- Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM. 2003a. Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina. *Revista portuguesa de ciências veterinárias* 98: 53-60.
- Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM. 2005. Comparison between different dilution rates on canine semen freezing using Tris-buffer with the addition of egg-yolk and glycerol. *Arq Bras Med Vet Zootec* 57: 764-771.
- Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM. 2006a. Comparação entre a água de coco em pó (ACP®) e o Tris como diluidores na criopreservação do sêmen de cães. *Braz J Vet Res Anim Sci* 43: 767-774.
- Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM. 2006b. Influence of temperature during glycerol addition and post-thaw dilution on the quality of canine frozen semen. *Reprod Dom Anim* 41: 74-78.
- Silva AR, Cardoso RCS, Uchoa DC, Silva LDM. 2002. Effect of Tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. *The Vet J* 164: 244-246.
- Silva AR, Cardoso RCS, Uchoa DC, Silva LDM. 2003b. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology* 59: 821-829.
- Silva AR. 2005. Criopreservação do sêmen canino diluído em Tris: avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos. Tesis de doctorado en Ciencias Veterinarias. Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará. 165 p.
- Silva AR. 2007. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 31 (Supl.1): 119-127.
- Silva LDM, Onclin K, Lejeune B, Verstegen JP. 1996. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet Rec* 138: 154-157.

- Silva LDM, Verstegen J. 1995. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen thawed spermatozoa. *Theriogenology* 44 (Suppl. 4): 571-579.
- Sirivaidyapong S, Ursen P, Bevers MM, Colenbrander B. 2001. Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa. *J Reprod Fertil* 57: 383-386.
- Songsasen N, Tong J, Leibo SP. 1998. Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death. *J Exp Zool* 280: 189-196.
- Stilley K, Pope CE, Leibo SP. 2000. Survival of canine epididymal sperm stored at 4°C in the testicles. *Theriogenology* 53: 489 abstr.
- Ström B, Rota A, Linde-Forsberg C. 1997. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* 48: 247-256.
- Taha MB, Noakes DE, Allen WE. 1981. The effect of season of the year on the characteristics and composition of dog semen. *J Small Anim Pract* 22: 177-184.
- Thomassen R, Sanson G, Krogenaes A, Fougner JA, Berg KA, Farstad W. 2006. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. *Theriogenology* 66: 1645-1650.
- Tittarelli C, Savignone CA, Arnaudín E, Stornelli MC, Stornelli MA, De la Sota RL. 2006. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology* 66: 1637-1640.
- Tittarelli CM, Stornelli MC, Gimenez F, Savignone CA, De la Rota RL, Stornelli MA. 2007. Recuperación espermática epididimal como medio para preservar material genético. *Revista Veterinaria Cuyana* 2: 16-20.
- Trigo FJ, Mateos AP. 1993. *Patología General Veterinaria*. 2ª ed. México: Mc.Graw Hill-Interamericana. 242 p.

- Tsutsui T, Hase M, Hori T. 2000. Effect of addition of Orvus ES paste to frozen canine semen extender on sperm acrosomes. *J Vet Med Sci* 62: 537-538.
- Verstegen JP, Onclin K, Iguer-Ouada M. 2005. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris–glucose extender: In vitro and in vivo studies. *Theriogenology* 64 (Suppl. 3): 720–733.
- Vila L. 1984. Principios químico-físicos de la criopreservación de material biológico. *Biol Clin Hematol* 6: 227-236.
- Villaverde AI, Martins MIM, Castro VB, Lopes MD. 2006. Morphologic and functional characteristics of chilled semen obtained from domestic feline epididymides (*Felis catus*). *Theriogenology* 66: 1641-1644.
- Watson PF. 1979. The preservation of semen in mammals. *Oxford Rev Reprod Biol* 1: 183-350.
- Watson PF. 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes En: Morris EJ, Clark A, eds. *The effects of low temperatures on biological membranes*. London: Academic Press. p 189-218."
- Watson PF. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 7: 871-891.
- Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61: 481-492.
- Way AL, Griel LC, Killian GJ. 2000. Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. *J Androl* 21: 213-219.
- Wite IG. 1988. Secreções do trato reprodutivo masculino e plasma seminal. En: Hafez ESE, ed. *Reprodução animal*. 4ª ed. São Paulo: Manole. p 212-228.

- Woodall PF, Johnstone IP. 1988. Dimensions and allometry of testes, epididymides and spermatozoa in the domestic dog. *J Reprod Fertil* 82: 603-609.
- Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 48: 146-156.
- Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 54: 579-585.
- Yu I, Leibo SP. 2002. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology* 57: 1179-1190.
- Yu I, Songsasen N, Godke RA, Leibo SP. 2002. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology* 44: 62-78.
- Zar, J. 1999. *Biostatistical analysis*. 4^a ed. New Jersey: Prentice Hall. 929 p.
- Zúccari CESN. 1998. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina. Tesis de doctorado. Botucatu: Universidade Estadual Paulista. 121p.

VIII. APÉNDICE

Apéndice 1. Preparación de dilutor para congelar semen canino (adaptado de Bateman, 2001 y Hermansson y Forsberg, 2006)

Reactivo	Peso	Marca
Tris	3.0250 g	Sigma (252859)
Ácido Cítrico	1.4409 g	Sigma (C0759)
Fructosa	1.1260 g	Sigma (F0127)
Agua bidestilada csp.	100 ml	Trifarma

Apéndice 2. Preparación Test Hiposmótico (HOST) (adaptado de Jeyendran *et al.*, 1984)

Reactivo	Peso	Marca
Citrato de Sodio	0.735 g	Sigma (S4641)
Fructosa	1.351 g	Sigma (F0127)
Agua bidestilada csp.	100 ml	Trifarma

Apéndice 3. Grupo 0: Procedencia y evaluación de testículos/epidídimos de caninos recuperados a las 0 horas post-orquiectomía

n	Animal / Procedencia	Pre-congelación				Post-congelación			
		MT (%)	MP (%)	MF (%)	Concentración (millones/ml)	IFM (%)	MT (%)	MP (%)	IFM (%)
1	Cruzado, 2 años / Lab. Necropsia	80	15	93.3	85	85.3	18	5	76
2	Cruzado, 3 años / Lab. Necropsia	85	75	87	187.5	73	30	10	58.4
3	Labrador, 5 años / Mun. La Molina	70	45	90.5	62.5	72.1	15	5	32
4	Cruzado, 4 años / Mun. La Molina	75	40	93	122.5	78.6	18	10	46
5	Boxer, 7 años / Mun. La Molina	80	55	68	42.5	76.5	30	20	81.5
6	Cruzado, 2 años / Mun. La Molina.	75	65	95.3	112.5	75.5	10	3	47
7	Cruzado, 2 años / Callao	85	65	89.7	27.5	76	12	8	45
8	Cruzado, 3 años / Callao	80	65	93.9	35	80.2	7	3	35
9	Cruzado, 1 año 1/2 / Callao	85	80	96.1	17.5	74.6	15	3	40
10	Cruzado, 8 años / Mun. La Molina.	80	50	87	107.5	72.5	15	5	44

MT: Motilidad total, MP: Motilidad progresiva, MF: Morfología (normales), IFM: Integridad funcional de membrana

Apéndice 4. Grupo 24: Procedencia y evaluación de testículos/epidídimos de caninos recuperados a las 24 horas post-orquiectomía

n	Animal / Procedencia	Pre-congelación				Post-congelación			
		MT (%)	MP (%)	MF (%)	Concentración (millones/ml)	IFM (%)	MT (%)	MP (%)	IFM (%)
11	Cruzado, 6 años / Cirugía	75	60	57.5	75	59	15	5	41.5
12	Boxer, 8 años / Lab. Necropsia	60	50	74.9	2.5	29	10	2	25
13	Cruzado, 2 años / Lab. Necropsia	75	20	56.4	110	71.1	15	5	50.5
14	Cruzado, 5 años / Cirugía	80	30	92.2	20	73.5	12	7	55.8
15	Cruzado, 5 años / Cirugía	80	40	86	15	76.9	15	10	68.5
16	Cruzado, 3 años / Lab. Necropsia	60	10	47.2	10	60.9	10	4	55
17	Cruzado, 3 años / Lab. Necropsia	70	60	83	135	70.2	20	10	61.9
18	Cruzado, 3 años / Mun. La Molina	60	50	80.1	127.5	65.1	10	5	36
19	Cruzado, 4 años / Mun. La Molina	60	40	83.5	50	66	20	10	43.5
20	Labrador, 8 años / Mun. La Molina.	70	60	88.1	165	69.6	10	3	49

MT: Motilidad total, MP: Motilidad progresiva, MF: Morfología (normales), IFM: Integridad funcional de membrana

Apéndice 5. Grupo 48: Procedencia y evaluación de testículos/epidídimos de caninos recuperados a las 48 horas post-orquiectomía

n	Animal / Procedencia	Pre-congelación				Post-congelación			
		MT (%)	MP (%)	MF (%)	Concentración (millones/ml)	IFM (%)	MT (%)	MP (%)	IFM (%)
21	Cruzado, 5 años / Cirugía	70	40	89.3	140	83	10	5	74.5
22	Cruzado, 6 años / Cirugía	60	40	62.9	15	54.5	10	2	36.5
23	Cruzado, 5 años / Cirugía	70	50	80.5	67.5	59	8	1	12.5
24	Cruzado, 5 años / Cirugía	65	50	80.6	72.5	59.5	10	2	18
25	Cruzado, 3 años / Mun. La Molina	50	25	35.7	15	75.5	9	1	30.5
26	Boxer, 7 años / Mun. La Molina	70	45	84.1	28	75.4	25	10	81
27	Boxer, 3 años / Mun. La Molina	75	70	89.1	140	79.7	20	8	75.7
28	Cruzado, 1 año 1/2 / SJL	70	50	84.4	32.5	74.4	8	3	56.5
29	Cruzado, 1 año 1/2 / SJL	70	40	85.7	20	82.2	6	3	65.8
30	Cruzado, 1 año 1/2 / Callao	65	40	70.6	7.5	51	8	2	38

MT: Motilidad total, MP: Motilidad progresiva, MF: Morfología (normales), IFM: Integridad funcional de membrana

Apéndice 6. Grupo 72: Procedencia y evaluación de testículos/epidídimos de caninos recuperados a las 72 horas post-orquiectomía

n	Animal / Procedencia	Pre-congelación				Post-congelación			
		MT (%)	MP (%)	MF (%)	Concentración (millones/ml)	IFM (%)	MT (%)	MP (%)	IFM (%)
31	Cruzado, 5 años / Cirugía	65	25	61.7	240	85	15	5	60.5
32	Cruzado, 3 años / Mun. La Molina	40	25	44.3	20	78	5	3	72.5
33	Cruzado, 4 años / Lab. Necropsia	40	20	78.2	50	53.5	3	1	33.6
34	Cruzado, 4 años / Lab. Necropsia	35	25	88.2	75	63.5	2	1	34.1
35	Cruzado, 8 años / Mun. La Molina	40	20	57.1	15	62.5	5	2	40.5
36	Cruzado, 3 años / Mun. La Molina	50	30	77.4	35	63.8	2	0	33.7
37	Boxer, 3 años / Mun. La Molina	65	55	76.3	147.5	78.7	10	3	67
38	Cruzado, 2 años / Mun. La Molina	65	40	58.5	37.5	79.3	5	2	54.8
39	Cruzado, 2 años / Mun. La Molina	50	20	48	10	63.1	2	1	36
40	Cruzado, 3 años / Callao	70	40	51.7	25	62	3	0	37.5

MT: Motilidad total, MP: Motilidad progresiva, MF: Morfología (normales), IFM: Integridad funcional de membrana

Apéndice 7. Tabla de análisis de datos de motilidad total antes de la criopreservación con programa estadístico Prism ® versión 3.0

Table Analyzed				
Motilidad total pre-congelación				
One-way analysis of variance				
P value	P<0.0001			
P value summary	***			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	4			
F	16.74			
R squared	0.5825			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	6.076			
P value	0.108			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	1469	3	489.6	
Residual (within columns)	1053	36	29.24	
Total	2521	39		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
Tiempo 0 vs Tiempo 24	6.862	4.013	P < 0.05	0.3425 to 13.38
Tiempo 0 vs Tiempo 48	8.496	4.968	P < 0.01	1.976 to 15.02
Tiempo 0 vs Tiempo 72	17.02	9.953	P < 0.001	10.50 to 23.54
Tiempo 24 vs Tiempo 48	1.634	0.9556	P > 0.05	-4.886 to 8.154
Tiempo 24 vs Tiempo 72	10.16	5.94	P < 0.001	3.638 to 16.68
Tiempo 48 vs Tiempo 72	8.524	4.985	P < 0.01	2.004 to 15.04

Apéndice 8. Tabla de análisis de datos de motilidad progresiva antes de la criopreservación con programa estadístico Prism ® versión 3.0

Table Analyzed				
Motilidad progresiva pre-congelación				
One-way analysis of variance				
P value	0.0092			
P value summary	**			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	4			
F	4.455			
R squared	0.2707			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	4.048			
P value	0.2564			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	1187	3	395.7	
Residual (within columns)	3197	36	88.81	
Total	4384	39		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
Tiempo 0 vs Tiempo 24	8.266	2.774	P > 0.05	-3.096 to 19.63
Tiempo 0 vs Tiempo 48	6.08	2.04	P > 0.05	-5.282 to 17.44
Tiempo 0 vs Tiempo 72	15.24	5.114	P < 0.01	3.877 to 26.60
Tiempo 24 vs Tiempo 48	-2.186	0.7335	P > 0.05	-13.55 to 9.176
Tiempo 24 vs Tiempo 72	6.973	2.34	P > 0.05	-4.389 to 18.33
Tiempo 48 vs Tiempo 72	9.159	3.073	P > 0.05	-2.203 to 20.52

Apéndice 9. Tabla de análisis de datos de integridad funcional de membrana antes de la criopreservación con programa estadístico Prism ® versión 3.0

Table Analyzed			
HOST pre-congelación			
<i>One-way analysis of variance</i>			
P value	0.093		
P value summary	ns		
Are means signif. different? (P < 0.05)	No		
Number of groups	4		
F	2.307		
R squared	0.1613		
<i>Bartlett's test for equal variances</i>			
Bartlett's statistic (corrected)	8.562		
P value	0.0357		
P value summary	*		
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes		
<i>ANOVA Table</i>	SS	df	MS
Treatment (between columns)	300.6	3	100.2
Residual (within columns)	1563	36	43.43
Total	1864	39	
<i>No post tests. P > 0.05</i>			

Apéndice 10. Tabla de análisis de datos de morfología antes de la criopreservación con programa estadístico Prism ® versión 3.0

Table Analyzed				
Morfología				
One-way analysis of variance				
P value	0.0042			
P value summary	**			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	4			
F	5.344			
R squared	0.3338			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	1.712			
P value	0.6342			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	1467	3	489	
Residual (within columns)	2928	32	91.51	
Total	4396	35		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
Tiempo 0 vs Tiempo 24	12.32	3.864	P < 0.05	0.09476 to 24.55
Tiempo 0 vs Tiempo 48	9.969	3.126	P > 0.05	-2.257 to 22.20
Tiempo 0 vs Tiempo 72	17.59	5.517	P < 0.01	5.365 to 29.82
Tiempo 24 vs Tiempo 48	-2.352	0.7377	P > 0.05	-14.58 to 9.874
Tiempo 24 vs Tiempo 72	5.27	1.653	P > 0.05	-6.956 to 17.50
Tiempo 48 vs Tiempo 72	7.622	2.39	P > 0.05	-4.604 to 19.85

Apéndice 11. Tabla de análisis de datos de concentración antes de la criopreservación con programa estadístico Prism ® versión 3.0

Table Analyzed			
Concentración			
One-way analysis of variance			
P value	0.8005		
P value summary	Ns		
Are means signif. different? (P < 0.05)	No		
Number of groups	4		
F	0.3345		
R squared	0.02712		
Bartlett's test for equal variances			
Bartlett's statistic (corrected)	1.503		
P value	0.6816		
P value summary	ns		
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No		
ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	3602	3	1201
Residual (within columns)	129200	36	3590
Total	132800	39	
No post tests. P > 0.05			

Apéndice 12. Tabla de análisis de datos de motilidad total después de la criopreservación con programa estadístico Prism ® versión 3.0

Table Analyzed				
Motilidad total post-congelación				
One-way analysis of variance				
P value	P<0.0001			
P value summary	***			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	4			
F	10.65			
R squared	0.4702			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	2.672			
P value	0.4451			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	734.3	3	244.8	
Residual (within columns)	827.4	36	22.98	
Total	1562	39		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
Tiempo 0 vs Tiempo 24	2.353	1.552	P > 0.05	-3.427 to 8.133
Tiempo 0 vs Tiempo 48	4.624	3.05	P > 0.05	-1.156 to 10.40
Tiempo 0 vs Tiempo 72	11.47	7.567	P < 0.001	5.692 to 17.25
Tiempo 24 vs Tiempo 48	2.271	1.498	P > 0.05	-3.509 to 8.051
Tiempo 24 vs Tiempo 72	9.119	6.015	P < 0.001	3.339 to 14.90
Tiempo 48 vs Tiempo 72	6.848	4.517	P < 0.05	1.068 to 12.63

Apéndice 13. Tabla de análisis de datos de motilidad progresiva después de la criopreservación con programa estadístico Prism ® versión 3.0

Table Analyzed				
Motilidad progresiva post-congelación				
One-way analysis of variance				
P value	0.0006			
P value summary	***			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	4			
F	7.28			
R squared	0.3776			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	1.174			
P value	0.7594			
P value summary	ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	419.8	3	139.9	
Residual (within columns)	692	36	19.22	
Total	1112	39		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
Tiempo 0 vs Tiempo 24	0.95	0.6852	P > 0.05	-4.336 to 6.236
Tiempo 0 vs Tiempo 48	4.494	3.241	P > 0.05	-0.7921 to 9.780
Tiempo 0 vs Tiempo 72	8.219	5.928	P < 0.001	2.933 to 13.51
Tiempo 24 vs Tiempo 48	3.544	2.556	P > 0.05	-1.742 to 8.830
Tiempo 24 vs Tiempo 72	7.269	5.243	P < 0.01	1.983 to 12.56
Tiempo 48 vs Tiempo 72	3.725	2.687	P > 0.05	-1.561 to 9.011

Apéndice 14. Tabla de análisis de datos de integridad funcional de membrana después de la criopreservación con programa estadístico Prism ® versión 3.0

Table Analyzed			
HOST post-congelación			
<i>One-way analysis of variance</i>			
P value	0.9767		
P value summary	ns		
Are means signif. different? (P < 0.05)	No		
Number of groups	4		
F	0.0677		
R squared	0.00561		
<i>Bartlett's test for equal variances</i>			
Bartlett's statistic (corrected)	5.303		
P value	0.1509		
P value summary	ns		
Do the variances differ signif.(P < 0.05)	No		
<i>ANOVA Table</i>	SS	df	MS
Treatment (between columns)	24.01	3	8.003
Residual (within columns)	4255	36	118.2
Total	4279	39	
<i>No post tests. P > 0.05</i>			